

CFM03526
10/810,500 US
CN

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 2004年 3月17日
Date of Application:

出願番号 特願2004-077045
Application Number:

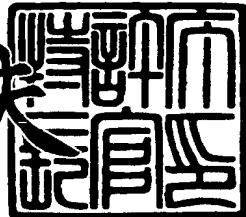
[ST. 10/C] : [JP2004-077045]

出願人 キヤノン株式会社
Applicant(s):

2004年 4月19日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
 【整理番号】 5521784-01
 【提出日】 平成16年 3月17日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 C12Q 1/68
 【発明者】
 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
 【氏名】 山本 伸子
 【発明者】
 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
 【氏名】 川口 正浩
 【発明者】
 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
 【氏名】 鈴木 智博
 【発明者】
 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
 【氏名】 吉井 裕人
 【発明者】
 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
 【氏名】 石井 美絵
 【発明者】
 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
 【氏名】 塚田 譲
 【発明者】
 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
 【氏名】 小倉 真哉
 【発明者】
 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
 【氏名】 福井 寿文
 【特許出願人】
 【識別番号】 000001007
 【氏名又は名称】 キヤノン株式会社
 【代理人】
 【識別番号】 100076428
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 大塚 康徳
 【電話番号】 03-5276-3241
 【選任した代理人】
 【識別番号】 100112508
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 高柳 司郎
 【電話番号】 03-5276-3241
 【選任した代理人】
 【識別番号】 100115071
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 大塚 康弘
 【電話番号】 03-5276-3241

【選任した代理人】

【識別番号】 100116894

【弁理士】

【氏名又は名称】 木村 秀二

【電話番号】 03-5276-3241

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2003- 99452

【出願日】 平成15年 4月 2日

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2003- 99453

【出願日】 平成15年 4月 2日

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2003- 99454

【出願日】 平成15年 4月 2日

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2003- 99455

【出願日】 平成15年 4月 2日

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2003- 99456

【出願日】 平成15年 4月 2日

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2003- 99457

【出願日】 平成15年 4月 2日

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2003- 99458

【出願日】 平成15年 4月 2日

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2003- 99459

【出願日】 平成15年 4月 2日

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2003- 99460

【出願日】 平成15年 4月 2日

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2003- 99461

【出願日】 平成15年 4月 2日

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2003- 99462

【出願日】 平成15年 4月 2日

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2003- 99463

【出願日】 平成15年 4月 2日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003458

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0102485

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

感染症起炎菌遺伝子を検出するための感染症起炎菌検出用プローブセットであって、

SEQ ID No. 1～14の塩基配列及びその相補配列を含む第1群と、SEQ ID No. 15～24の塩基配列及びその相補配列を含む第2群と、SEQID No. 25～36の塩基配列及びその相補配列を含む第3群と、SEQ ID No. 37～47の塩基配列及びその相補配列を含む第4群と、SEQ IDNo. 48～57の塩基配列及びその相補配列を含む第5群と、SEQ ID No. 58～68の塩基配列及びその相補配列を含む第6群と、SEQ ID No. 69～77の塩基配列及びその相補配列を含む第7群と、SEQID No. 78～85の塩基配列及びその相補配列を含む第8群と、SEQ ID No. 86～97の塩基配列及びその相補配列を含む第9群と、SEQ IDNo. 98～106の塩基配列及びその相補配列を含む第10群より選択された複数群の各々から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドで形成される複数種類のプローブを含むことを特徴とする感染症起炎菌検出用プローブセット。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の感染症起炎菌検出用プローブセットに含まれるプローブが化学的に固定されている担体。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の担体を用いて感染症起炎菌遺伝子を検出する遺伝子検査方法。

【請求項 4】

SEQ ID No. 1～14の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とする黄色ブドウ球菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。

【請求項 5】

SEQ ID No. 1～14の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの 1 種類以上の感染症検出用プローブを含むことを特徴とする黄色ブドウ球菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のプローブセットに含まれる感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の担体を用いて黄色ブドウ球菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項 8】

SEQ ID No. 15～24の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とする表皮ブドウ球菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。

【請求項 9】

SEQ ID No. 15～24の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの 1 種類以上の感染症検出用プローブを含むことを特徴とする表皮ブドウ球菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のプローブセットに含まれる感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の担体を用いて表皮ブドウ球菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項 12】

SEQ ID No. 25～36の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る、大腸菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。

【請求項 13】

SEQ ID No. 25～36の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの1種類以上の感染症検出用プローブを含む、大腸菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。

【請求項14】

請求項12に記載の感染症検出用プローブのうち、少なくとも1種類の感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

【請求項15】

請求項13に記載の担体を用いて大腸菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項16】

SEQ ID No. 37～47の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とする肺炎桿菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。

【請求項17】

SEQ ID No. 37～47の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの1種類以上の感染症検出用プローブを含むことを特徴とする肺炎桿菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。

【請求項18】

請求項17に記載の感染症検出用プローブのうち、少なくとも1種類の感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

【請求項19】

請求項18に記載の担体を用いて肺炎桿菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項20】

SEQ ID No. 48～57の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とする緑膿菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。

【請求項21】

SEQ ID No. 48～57の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの1種類以上の感染症検出用プローブを含むことを特徴とする緑膿菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。

【請求項22】

請求項21に記載のプローブセットに含まれる感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

【請求項23】

請求項22に記載の担体を用いてセラチア球菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項24】

SEQ ID No. 58～68の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とするセラチア菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。

【請求項25】

SEQ ID No. 58～68の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの1種類以上の感染症検出用プローブを含むことを特徴とするセラチア菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。

【請求項26】

請求項25に記載のプローブセットに含まれる感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

【請求項27】

請求項26に記載の担体を用いてセラチア球菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項28】

SEQ ID No.69~77の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とする肺炎連鎖球菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。

【請求項29】

SEQ ID No.69~77の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの1種類以上の感染症検出用プローブを含むことを特徴とする肺炎連鎖球菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。

【請求項30】

請求項29に記載の感染症検出用プローブのうち、少なくとも1種類の感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

【請求項31】

請求項30に記載の担体を用いて肺炎連鎖球菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項32】

SEQ ID No.78~85の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とするインフルエンザ菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。

【請求項33】

SEQ ID No.78~85の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの1種類以上の感染症検出用プローブを含むことを特徴とするインフルエンザ菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。

【請求項34】

請求項33に記載の感染症検出用プローブのうち、少なくとも1種類の感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

【請求項35】

請求項34に記載の担体を用いてインフルエンザ菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項36】

SEQ ID No.86~97の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とするエンテロバクタークロアカエ菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。

【請求項37】

SEQ ID No.86~97の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの1種類以上の感染症検出用プローブを含むことを特徴とするエンテロバクタークロアカエ菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。

【請求項38】

請求項37に記載の感染症検出用プローブのうち、少なくとも1種類の感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

【請求項39】

請求項38に記載の担体を用いてエンテロバクター クロアカエ菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項40】

SEQ ID No.98~106の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とするエンテロコッカウフェカリス菌由来の遺伝子を検出可能な感染症検出用プローブ。

【請求項41】

SEQ ID No.98~106の塩基配列及びその相補配列のうちのいずれかを有するオリゴヌクレオチドから成る感染症検出用プローブのうちの1種類以上の感染症検出用プローブを含む

ことを特徴とするエンテロコッカウフェカリス菌由来の遺伝子を検出可能なプローブセット。

【請求項42】

請求項41に記載の感染症検出用プローブのうち、少なくとも1種類の感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

【請求項43】

請求項42に記載の担体を用いてエンテロコッカス フェカリス菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

【請求項44】

感染症起炎菌の16s rRNA遺伝子配列をPCR増幅させるのに用いられるプライマーであって、

SEQ ID No.73～78の塩基配列のいずれかを有するオリゴヌクレオチドからなることを特徴とする感染症起炎菌増幅反応用プライマー。

【請求項45】

ヒトゲノムDNAの塩基配列と3塩基以上配列が異なることを特徴とする請求項44に記載の感染症起炎菌増幅反応用プライマー。

【請求項46】

感染症起炎菌の16s rRNA遺伝子配列をPCR増幅させるのに用いられるプライマーセットであって、

SEQ ID No.107～109の塩基配列のうちの少なくとも一つ以上と、SEQ ID No.110～112の塩基配列のうちの少なくとも一つ以上の複数の塩基配列の各々を有するオリゴヌクレオチドからなる複数のプライマーを含むことを特徴とする感染症起炎菌増幅反応用プライマーセット。

【請求項47】

ヒト血液検体に対して、該プライマーセットのうちの全てを同時に用いて、PCR反応させることを特徴とする請求項46記載の感染症起炎菌増幅反応用プライマーセット。

【請求項48】

請求項46に記載の感染症起炎菌増幅反応用プライマーセットを用いてPCR増幅処理を行なってDNAプローブによる感染症起炎菌の検出を行なうことを特徴とする感染症起炎菌検出方法。

【請求項49】

感染症起炎菌遺伝子を検出するための感染症起炎菌検出用プローブセットであって、

SEQ ID No.1～9の塩基配列及びその相補配列を含む第1群と、SEQ ID No.15～21の塩基配列及びその相補配列を含む第2群と、SEQID No.25～31の塩基配列及びその相補配列を含む第3群と、SEQ ID No.37～42の塩基配列及びその相補配列を含む第4群と、SEQ ID No.48～55の塩基配列及びその相補配列を含む第5群と、SEQ ID No.58～62の塩基配列及びその相補配列を含む第6群と、SEQ ID No.69～75の塩基配列及びその相補配列を含む第7群と、SEQID No.78～84の塩基配列及びその相補配列を含む第8群と、SEQ ID No.86～92の塩基配列及びその相補配列を含む第9群と、SEQ ID No.98～105の塩基配列及びその相補配列を含む第10群より選択された複数群の各々から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドで形成される複数種類のプローブを含むことを特徴とする感染症起炎菌検出用プローブセット。

【書類名】明細書

【発明の名称】感染症起炎菌検出用プローブ及びプローブセット、ならびに担体及び遺伝子検査方法

【技術分野】**【0001】**

本発明は、感染症疾患の原因菌である感染症起炎菌の検出及び／又は同定に関する。特に、感染症疾患の原因菌の検出および同定に有用な感染症起因菌由来のプローブ及び、プローブセットならびに担体、遺伝子検査方法に関するものである。

【0002】

また、感染症起炎菌の検出及び／又は同定に好適な感染症起炎菌のPCR增幅処理に関する。

【背景技術】**【0003】**

近年、DNAチップ（またはDNAマイクロアレイともいう。以下同じ）を用いた遺伝子発現解析が創薬を初め種々の領域で行なわれている。それは、各種遺伝子セット（プローブ）が配置されたDNAマイクロアレイに、それぞれ異なった検体DNAを反応させ、各検体に存在するそれぞれの遺伝子量を比較して、各ステージで大量に存在する（発現量の高い）遺伝子、或いは逆に不活性化している（発現量の低い）遺伝子を分類し、機能と関連付けて解析するものである。

【0004】

感染症の起炎菌検査はその一例であり、江崎らは特許文献1において、DNAプローブとして染色体DNAが固定化されたDNAチップを用いる微生物同定法を提案している。この方法によれば、互いにGC含量の異なる複数の既知微生物由来の染色体DNAと、検体中の未知微生物由来の染色体DNAとを反応させ、生じたハイブリダイゼーション複合体を検出することで検体中の未知微生物を検出することが可能である。

【0005】

また、大野らは感染症の起炎菌検査のためのDNAチップに用いるプローブとして、特許文献2で制限酵素断片を利用した真菌の検出用プローブを、特許文献3で緑膿菌の検出用プローブを、特許文献4でEscherichia coli（エシレリキア コリ）菌、klebsiella pneumoniae（クレブシエラ ニューモニエ）菌ならびにEnterobacter cloacae（エンテロバクター クロアカエ）菌の制限酵素断片を利用した検出用プローブをそれぞれ提案している。

【0006】

また、上記マイクロアレイとしては、例えば、スタンフォード法と呼ばれるスタンピング法によるマイクロアレイが知られており、例えば、宝酒造株式会社からがん疾患に関するヒト由来既知遺伝子のcDNA断片をスポット或いはスタンプにより塗布したDNAチップ、ヒト由来既知遺伝子約1000種類のcDNA断片をスライドガラスに貼り付けたチップが市販されている。

【0007】

一方、Affymetrixのチップは、上記既知遺伝子cDNAを元にオリゴヌクレオチドプローブセットを設計し、基板上の合成によりプローブを配置したもので、一枚のチップ上に高密度にオリゴプローブが配置され、一度に一万を超える遺伝子の発現レベルを解析できるように設計されている。

【特許文献1】特開2001-299396号公報

【特許文献2】特開平6-133798号公報

【特許文献3】特開平10-304896号公報

【特許文献4】特開平10-304897号公報

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0008】**

しかしながら、上記従来技術に示したDNAチップは、染色体DNA或いは制限酵素断片等のDNAプローブを利用するものであり、いずれも微生物から直接取り出したDNAを材料としている。このため、一度に大量に調製することは困難であり、臨床診断用には適さないという問題があった。これは臨床診断用に用いるためには、安価で均質なDNAチップの大量生産が必要であり、このためにプローブ溶液として均質なDNAの大量調製が不可欠となってくるところ、DNAプローブでは、このような大量調製ができないからである。なお、DNAプローブであっても、PCR增幅反応を利用することで当該DNAを徐々に増加させていくことは可能であるが、PCR反応では、一度に大量調製することは困難であることから、臨床診断用に利用することは難しい。

【0009】

また、DNAプローブは塩基長が長いため、類似菌種間における菌種の同定が困難であり、例えば感染症検出用には適さないという問題があった。これは、感染症の治療においては菌種の特定とそれに応じた抗生剤の選択・投与が必要であり、このために感染症検出用プローブには、同種内の詳細な区別までは必要としないまでも（つまり同種内は一括検出でき）、類似する他の種の細菌は区別して検出できるような機能が求められるからである。一方、例えば特許文献4で示されているエシエリキア コリ菌、クレブシエラ ニューモニエ菌、エンテロバクター クロアカエ菌の制限酵素断片を用いたDNAチップでは、プローブの塩基長が長いために、これら3菌種相互間に交差反応が生じてしまい、類似する個々の菌を区別することができず、感染症検出用に利用することは難しい。

【0010】

また、以上のようなマイクロアレイの用途として、感染症の起炎菌検査が注目されており、感染症起炎菌検査を目的としたプローブセットの提案もいくつかなされている。

【0011】

マイクロアレイを用いた細菌検査における重要なポイントは、感染菌数が少なくとも検出できることである。そのために、プライマーを用いたPCR反応等による感染菌のDNAの塩基配列における特定の部位を增幅することが有効である。例えば、16s rRNA遺伝子配列はおよそ1700塩基対の情報中に菌種特有な配列を含み、その配列を利用することによりある程度の分類が可能であると考えられている。したがって、細菌の検出／同定においては、細菌のDNA塩基配列中の16srRNA部分を用いるのが好ましい。したがって、この16s rRNA部分を増幅することが要望されている。

【0012】

しかしながら、種々の菌の遺伝子配列は部分的には明らかにされていても、16s rRNAの全長が解明されている訳ではなく、PCR増幅反応用のプライマーの設計は容易ではない。

【0013】

本発明は、上記に鑑みてなされたものであり、一度に大量調製することが可能であり、かつ、類似菌種間における菌種の同定が可能な感染症検出用プローブを提供することを目的とする。

【0014】

より具体的には、感染症の複数種の原因菌の種による分類に適した感染症検出用プローブセットを提供することを目的とするものである。

【0015】

また、これらの類似菌種間の差異がDNAチップ上で精度良く評価可能であるよう、感染症検出用プローブと検体とのハイブリッド体の安定性も考慮したプローブセットを提供することを目的とする。

【0016】

また、これらの感染症検出用プローブと検体との反応を行なう為に、これらの感染症検出用プローブが固定された担体を提供することを目的とする。

【0017】

さらに、検体溶液との反応の過程で、これらの感染症検出用プローブが安定に担体上に

固定され、再現性の高い検出結果を得るために、化学的に固定された担体を提供することを目的とする。

【0018】

また、感染症起炎菌の検出及び／又は同定を目的に、検体中の起炎菌の16s rRNAを増幅する為のPCR反応用プライマーを提供することを目的とする。

【0019】

また、本発明の他の目的は、複数の菌種に共通に利用可能で、菌種が不明な状態でも効果的に起炎菌の16s rRNAを増幅可能なプライマーセットを提供することにある。

【0020】

更に、本発明の他の目的は、複数種類の起炎菌の16s rRNAを同一PCR条件で増幅可能であるようなプライマーセットを提供することにある。

【0021】

また、ヒト血液検体に対して、該プライマーセットのうちの全てを同時に用いて、PCR反応を行なうことにより、ヒトゲノム由来の遺伝子を増幅することなく、上記菌種のいずれも増幅可能であることを特徴とするプライマーセットを提供する。具体的には、ヒトゲノム遺伝子と3塩基以上異なる配列を持つプライマーセットを提案する。

【課題を解決するための手段】

【0022】

上記の目的を達成するための本発明の一態様によれば、以下の感染症起炎菌検出用プローブセットが提供される。すなわち、

感染症起炎菌遺伝子を検出するための感染症起炎菌検出用プローブセットであって、

SEQ ID No.1～14の塩基配列及びその相補配列を含む第1群と、SEQ ID No.15～24の塩基配列及びその相補配列を含む第2群と、SEQID No.25～36の塩基配列及びその相補配列を含む第3群と、SEQ ID No.37～47の塩基配列及びその相補配列を含む第4群と、SEQ IDNo.48～57の塩基配列及びその相補配列を含む第5群と、SEQ ID No.58～68の塩基配列及びその相補配列を含む第6群と、SEQ ID No.69～77の塩基配列及びその相補配列を含む第7群と、SEQID No.78～85の塩基配列及びその相補配列を含む第8群と、SEQ ID No.86～97の塩基配列及びその相補配列を含む第9群と、SEQ IDNo.98～106の塩基配列及びその相補配列を含む第10群より選択された複数群の各々から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドで形成される複数種類のプローブを含む。

【発明の効果】

【0023】

本発明によれば、一度に大量調製することが可能であり、かつ、類似菌種間における菌種の同定が可能な感染症検出用プローブを提供することができる。より具体的には、感染症の複数種の原因菌の種による分類に適した感染症検出用プローブセットを提供することが可能となる。

【0024】

或いは、感染症の原因菌である例えば上記10種類の菌の検出に適した感染症検出用プローブを提供することが可能となる。

【0025】

また、これらの類似菌種間の差異がDNAチップ上で精度良く評価可能であるよう、感染症検出用プローブと検体とのハイブリッド体の安定性も考慮したプローブセットを提供することが可能となる。

【0026】

また、これらの感染症検出用プローブと検体との反応を行なう為に、これらの感染症検出用プローブが固定された担体を提供することができる。

【0027】

さらに、検体溶液との反応の過程で、これらの感染症検出用プローブが安定に担体上に固定され、再現性の高い検出結果を得るために、化学的に固定された担体が提供できる。

【0028】

また、本発明によれば、感染症起炎菌の検出及び／又は同定を目的とした、検体中の起炎菌の16s rRNAを増幅する為のPCR反応用プライマーが提供される。

また、本発明によれば、複数の菌種に共通に利用可能で、菌種が不明な状態でも効果的に起炎菌の16srRNAを増幅可能なプライマーセットが提供される。

更に、本発明によれば、複数種類の起炎菌の16srRNAを同一PCR条件で増幅可能であるようなプライマーセットが提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

以下の実施形態では、感染症の起炎菌同定の為のオリゴヌクレオチドプローブ、より具体的には、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌、セラチア菌、肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌、エンテロバクター クロアカエ菌、及びエンテロコッカス・フェカリス菌のいずれか、或いは複数菌を検出する為のプローブが示される。すなわち、上記10種類の感染症起炎菌の遺伝子のうちの16s rRNA遺伝子配列を過不足なく検出するための核酸プローブ或いは核酸プローブセットが開示される。

【0030】

本実施形態によれば、上記感染症起炎菌の遺伝子の核酸配列を含む検査溶液と反応せしめるための上記オリゴヌクレオチドプローブは、後述の表示1に示す第1群（添付配列表の配列番号（SEQ ID No.）1～14）、表2に示す第2群（配列番号15～24）、表3に示す第3群（配列番号25～36）、表4に示す第4群（配列番号37～47）、表5に示す第5群（配列番号48～57）、表6に示す第6群（配列番号58～68）、表7に示す第7群（配列番号69～77）、表8に示す第8群（配列番号78～85）、表9に示す第9群（配列番号86～97）、表10に示す第10群（配列番号98～106）のうちの一つの群に属する1つの塩基配列からなる。ここで、第1群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブは黄色ブドウ球菌を検出し、第2群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブは表皮ブドウ球菌を検出し、第3群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブは大腸菌を検出し、第4群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブは肺炎桿菌を検出し、第5群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブは緑膿菌を検出し、第6群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブはセラチア菌を検出し、第7群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブは肺炎連鎖球菌を検出し、第8群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブはインフルエンザ菌を検出し、第9群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブはエンテロバクター クロアカエ菌（以下、腸球菌）を検出し、第10群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブはエンテロコッカス・フェカリス菌を検出する。

【0031】

なお、これらのプローブ配列の相補的な配列（上記第1群の相補的な配列は添付配列表の配列番号113～126、第2群の相補的な配列は配列番号127～136、第3群の相補的な配列は配列番号137～148、第4群の相補的な配列は配列番号149～159、第5群の相補的な配列は配列番号160～169、第6群の相補的な配列は配列番号170～180、第7群の相補的な配列は配列番号181～189、第8群の相補的な配列は配列番号190～197、第9群の相補的な配列は配列番号198～209、第10群の相補的な配列は配列番号210～218である）もまた、同じ機能を有するためにプローブ配列として有効である。

【0032】

各菌のプローブの設計は、16s rRNAをコーディングしているゲノム部分より、当該菌に対し非常に特異性が高く、また、それぞれのプローブ塩基配列でばらつきがなく、十分なハイブリダイゼーション感度が期待できるようになつた。

【0033】

これらのオリゴヌクレオチドプローブは、担体上に結合された2種以上のプローブと検体とのハイブリダイゼーション反応において、安定なハイブリッド体を形成し、良好な結

果を与えるように設計されている。

【0034】

さらに、本発明にかかる感染症検出用プローブが固定された担体は、オリゴヌクレオチドをBJプリンタを用いて吐出し、化学的に結合させることで作製することを特徴としている。これにより、従来法に比べ、プローブがはがれにくくなるうえ、感度が向上するという付帯的な効果も得られる。つまり、従来から一般的に用いられるスタンフォード法と呼ばれるスタンピング法によりDNAチップを生成した場合（例えば、宝酒造は、がん疾患に関連するヒト由来既知遺伝子のcDNA断片をスポット或いはスタンプにより塗布することでDNAチップを生成している）、塗布したDNAがはがれやすいという欠点があった。また、従来のように、DNAチップ上で合成によりプローブを配置した場合（例えば、AffymetrixのDNAチップ等）は、各プローブ配列毎の合成収量が異なる為に、正確な評価ができないという欠点があった。本発明にかかる担体は、かかる点についても考慮して作製されており、従来に比べ安定に固定されはがれにくく、高感度と高精度の検出ができる点を特徴としている。以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

【0035】

本実施形態のDNAチップが検査の対象とする検体としては、ヒト、家畜等の動物由来の血液、髄液、喀痰、胃液、膣分泌物、口腔内粘液等の体液、尿及び糞便のような排出物等細菌が存在すると思われるあらゆる物を対象とする。また、食中毒、汚染の対象となる食品、飲料水及び温泉水のような自然環境中の水、空気清浄機や浄水器のフィルタ等、細菌による汚染が引き起こされる可能性のある媒体全てが挙げられる。さらに、輸出入における検疫等の動植物も検体としてその対象とする。

【0036】

また、本実施形態のDNAチップが対象とする検体としては、抽出した核酸そのものでも良いが、16s rRNA検出用に設計されたPCR反応用プライマーを用いて調製された增幅検体、或いはPCR增幅物を元にさらにPCR反応等を行なって調製された検体、PCR以外の増幅方法により調製された検体、可視化のために各種標識法により標識された検体等、いずれの調製法により調製された検体をも含む。

【0037】

また、本実施形態のDNAチップに用いられる担体は、ガラス基板、プラスチック基板、シリコンウェハー等の平面基板、凹凸のある三次元構造体、ビーズのような球状のもの、棒状、紐状、糸状のもの等あらゆるものを含む。さらに、その基板の表面をプローブDNAの固定化が可能なように処理したものも含む。特に、表面に化学反応が可能となるよう官能基を導入したものは、ハイブリダイゼーション反応の過程でプローブが安定に結合している為に、再現性の点で好ましい形態である。

【0038】

本発明に用いられる固定化方法としては、例えば、マレイミド基とチオール（-SH）基との組合せを用いる例が挙げられる。即ち核酸プローブの末端にチオール（-SH）基を結合させておき、固相表面がマレイミド基を有するように処理しておくことで、固相表面に供給された核酸プローブのチオール基と固相表面のマレイミド基とが反応して核酸プローブを固定化する。

【0039】

マレイミド基の導入方法としては、まず、ガラス基板にアミノシランカップリング剤を反応させ、次にそのアミノ基とEMCS試薬（N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimide:Dojin社製）との反応によりマレイミド基を導入する。DNAへのSH基の導入は、DNA自動合成機でDNAを合成する際に、5'-Thiol-ModifierC6（GlenResearch社製）を用いることにより行なうことができる。

【0040】

固定化に利用する官能基の組合せとしては、上記したチオール基とマレイミド基の組合せ以外にも、例えばエポキシ基（固相上）とアミノ基（核酸プローブ末端）の組合せ等が挙げられる。また、各種シランカップリング剤による表面処理も有効であり、該シ

ランカップリング剤により導入された官能基と反応可能な官能基を導入したオリゴヌクレオチドが用いられる。さらに、官能基を有する樹脂をコーティングする方法も利用可能である。

【0041】

以下、上述した10種の感染症起炎菌のそれぞれを検出するための感染症起炎菌検出用プローブを用いた実施例により、更に詳細に説明する。

【0042】

<実施例1> 1 Step PCR法を用いた微生物の検出

[1. プローブDNAの準備]

上記10種の起炎菌の株検出用プローブとして表1～10に示す核酸配列を設計した。具体的には、各菌の16s rRNAをコーディングしているゲノム部分より、以下に示したプローブ塩基配列を選んだ。これらのプローブ塩基配列群は、当該菌に対し非常に特異性が高く、それぞれのプローブ塩基配列でばらつきのない、十分なハイブリダイゼーション感度が期待できるように設計されている。なお、表1～10に示す各プローブ塩基配列はこれに完全に一致したものに限定される必要はなく、各プローブ塩基配列を含む20から30程度の塩基長を有するプローブ塩基配列も各表に示す各プローブ塩基配列に含まれるものとする。また、上述のように各表に示した塩基配列の相補的な配列（相補鎖）を用いてもよい。

【0043】

なお、以下の各表において、Probe No.は便宜的に割り当てた符号であり、配列番号は添付の配列表における配列番号と一致している。また、上述したように、配列番号1～106に対応する相補鎖配列は配列番号113～218に示してある。

【0044】

表1 黄色ブドウ球菌株検出用プローブ

| 微生物名 | Probe No. | 配列番号 | 配列 |
|---------|-----------|------|----------------------------------|
| 黄色ブドウ球菌 | PA-1 | 1 | 5' GAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGA 3' |
| | PA-2 | 2 | 5' CACTTATAGATGGATCCCGCGCTGC 3' |
| | PA-3 | 3 | 5' TGCACATCTGACGGTACCTAACAG 3' |
| | PA-4 | 4 | 5' CCCCTTAGTGCAGCTAACG 3' |
| | PA-5 | 5 | 5' AATACAAAGGGCAGCGAAACCGC 3' |
| | PA-6 | 6 | 5' CCGGTGGAGTAACCTTTAGGAGCT 3' |
| | PA-7 | 7 | 5' TAACCTTTAGGAGCTAGCCGTCGA 3' |
| | PA-8 | 8 | 5' TTTAGGAGCTAGCCGTCGAAGGT 3' |
| | PA-9 | 9 | 5' TAGCCGTCGAAGGTGGGACAAAT 3' |
| | PA-10 | 10 | 5' ACGGACGAGAAGCTGCTTCTCT 3' |
| | PA-11 | 11 | 5' TGTCACTTAGATGGATCCCGCGCT 3' |
| | PA-12 | 12 | 5' TGTAAGTAACGTGCACATCTGACG 3' |
| | PA-13 | 13 | 5' ACAACTCTAGAGATAGAGCCTCCCC 3' |
| | PA-14 | 14 | 5' GTGGAGTAACCTTTAGGAGCTAGCC 3' |

【0045】

表2 表皮ブドウ球菌株検出用プローブ

| 微生物名 | Probe No. | 配列番号 | 配列 |
|---------|-----------|------|-----------------------------------|
| 表皮ブドウ球菌 | PB-1 | 15 | 5' GAACAGACGAGGAGCTTGCTCC 3' |
| | PB-2 | 16 | 5' TAGTGAAGACGGTTTGCTGTCAC 3' |
| | PB-3 | 17 | 5' TAAGTAACATGACGTCTGACGGT 3' |
| | PB-4 | 18 | 5' GACCCCTCTAGAGATAGAGTTTCCC 3' |
| | PB-5 | 19 | 5' AGTAACCATTGGAGCTAGCCGTC 3' |
| | PB-6 | 20 | 5' GAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGC 3' |
| | PB-7 | 21 | 5' AGCCGGTGGAGTAACCATTGG 3' |
| | PB-8 | 22 | 5' AGACGAGGAGCTGCTCCTCTG 3' |
| | PB-9 | 23 | 5' AGAACAAATGTGTAAGTAACATGACGT 3' |
| | PB-10 | 24 | 5' ACCATTGGAGCTAGCCGTCGA 3' |

【0046】

表3 大腸菌株検出用プローブ

| 微生物名 | Probe No. | 配列番号 | 配列 |
|------|-----------|------|-----------------------------------|
| 大腸菌 | PC-1 | 25 | 5' CTCTTGCCATCGGATGTGCCCA 3' |
| | PC-2 | 26 | 5' ATACCTTGCTCATTGACGTTACCCG 3' |
| | PC-3 | 27 | 5' TTTGCTCATTGACGTTACCCGAG 3' |
| | PC-4 | 28 | 5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGA 3' |
| | PC-5 | 29 | 5' ATACAAAGAGAACGACCTCGCG 3' |
| | PC-6 | 30 | 5' CGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGT 3' |
| | PC-7 | 31 | 5' GCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAAT 3' |
| | PC-8 | 32 | 5' TAACAGGAAGAACGTTGCTTGTGCTG 3' |
| | PC-9 | 33 | 5' TTGCCATCGGATGTGCCAGAT 3' |
| | PC-10 | 34 | 5' GGAAGGGAGTAAAGTTAACCTTGCTC 3' |
| | PC-11 | 35 | 5' ATCTTTGTTGCCAGCGGTCCG 3' |
| | PC-12 | 36 | 5' AAGGGAGTAAAGTTAACCTTGCTCATG 3' |

【0047】

表4 肺炎桿菌株検出用プローブ

| 微生物名 | Probe No. | 配列番号 | 配列 |
|------|-----------|------|----------------------------------|
| 肺炎桿菌 | PD-1 | 37 | 5' TAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGG 3' |
| | PD-2 | 38 | 5' TCATGCCATCAGATGTGCCAGA 3' |
| | PD-3 | 39 | 5' CGGGGAGGAAGGCCATAAGGTTAAT 3' |
| | PD-4 | 40 | 5' TTCGATTGACGTTACCGCAGAAGA 3' |
| | PD-5 | 41 | 5' GGTCTGTCAGTCCGATGTGAAATCC 3' |
| | PD-6 | 42 | 5' GCAGGCTAGAGTCTGTAGAGGGG 3' |
| | PD-7 | 43 | 5' TCATGCCATCAGATGTGCCAGAT 3' |
| | PD-8 | 44 | 5' CGGGGAGGAAGGCCATAAGGTTAA 3' |
| | PD-9 | 45 | 5' TTATCGATTGACGTTACCGCAGAAGA 3' |
| | PD-10 | 46 | 5' CATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTC 3' |
| | PD-11 | 47 | 5' CCTTTGTTGCCAGCGGTAGGC 3' |

【0048】

表5 緑膿菌株検出用プローブ

| 微生物名 | Probe No. | 配列番号 | 配列 |
|------|-----------|------|--------------------------------------|
| 緑膿菌 | PE-1 | 4 8 | 5' TGAGGGAGAAAGTGGGGATCTC 3' |
| | PE-2 | 4 9 | 5' TCAGATGAGCCTAGGTGGATTAGC 3' |
| | PE-3 | 5 0 | 5' GAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGG 3' |
| | PE-4 | 5 1 | 5' GTACGGTAGAGGGTGGTGAATT 3' |
| | PE-5 | 5 2 | 5' GACCACCTGGACTGATACTGACAC 3' |
| | PE-6 | 5 3 | 5' TGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTC 3' |
| | PE-7 | 5 4 | 5' TTGTTACCAGCACCTCGGGTGG 3' |
| | PE-8 | 5 5 | 5' TAGTCTAACCGCAAGGGGGACG 3' |
| | PE-9 | 5 6 | 5' TGCATCCAAAACACTACTGAGCTAGAGTAC 3' |
| | PE-10 | 5 7 | 5' GTCGACTAGCCGTTGGGATCCT 3' |

【0049】

表6 セラチア菌株検出用プローブ

| 微生物名 | Probe No. | 配列番号 | 配列 |
|-------|-----------|------|-----------------------------------|
| セラチア菌 | PF-1 | 5 8 | 5' TAGCACAGGGAGCTTGCTCCCT 3' |
| | PF-2 | 5 9 | 5' AGGTGGTGAGCTTAATACGCTCATC 3' |
| | PF-3 | 6 0 | 5' TCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAG 3' |
| | PF-4 | 6 1 | 5' ACTGCATTGAAACTGGCAAGCTAGA 3' |
| | PF-5 | 6 2 | 5' TTATCCTTGTGAGCTTCGGCC 3' |
| | PF-6 | 6 3 | 5' ACTTCAGCGAGGAGGAAGGTGG 3' |
| | PF-7 | 6 4 | 5' GGTAGCACAGGGAGCTTGCTC 3' |
| | PF-8 | 6 5 | 5' CGAGGAGGAAGGTGGTGAGCTTAATA 3' |
| | PF-9 | 6 6 | 5' TACGCTCATCAATTGACGTTACTCGC 3' |
| | PF-10 | 6 7 | 5' GAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTACA 3' |
| | PF-11 | 6 8 | 5' TTATCCTTGTGCCAGCGGTTCG 3' |

【0050】

表7 肺炎連鎖球菌株検出用プローブ

| 微生物名 | Probe No. | 配列番号 | 配列 |
|--------|-----------|------|--------------------------------------|
| 肺炎連鎖球菌 | PG-1 | 6 9 | 5' AGTAGAACGCTGAAGGAGGGAGCTG 3' |
| | PG-2 | 7 0 | 5' CTTGCATCACTACCAGATGGACCTG 3' |
| | PG-3 | 7 1 | 5' TGAGAGTGGAAAGTTCACACTGTGAC 3' |
| | PG-4 | 7 2 | 5' GCTGTGGCTTAACCATAGTAGGCTTT 3' |
| | PG-5 | 7 3 | 5' AAGCGGCTCTGGCTTGTAACT 3' |
| | PG-6 | 7 4 | 5' TAGACCCCTTCCGGGTTAGTGC 3' |
| | PG-7 | 7 5 | 5' GACGGCAAGCTAATCTCTAAAGCCA 3' |
| | PG-8 | 7 6 | 5' GACATTGCTAAAAGGTGCACTTGCA 3' |
| | PG-9 | 7 7 | 5' GTTGTAAAGAGAAGAACGAGTGTGAGAGTG 3' |

【0051】

表8 インフルエンザ菌株検出用プローブ

| 微生物名 | Probe No. | 配列番号 | 配列 |
|--------------|-----------|------|------------------------------------|
| インフルエンザ 菌 | PH-1 | 7 8 | 5' GCTTGGGAATCTGGCTTATGGAGG 3' |
| | PH-2 | 7 9 | 5' TGCCATAGGATGAGCCCCAAGTGG 3' |
| | PH-3 | 8 0 | 5' CTTGGGAATGTACTGACGCTCATGTG 3' |
| | PH-4 | 8 1 | 5' GGATTGGGCTTAGAGCTTGGTGC 3' |
| | PH-5 | 8 2 | 5' TACAGAGGGAAAGCGAAGCTGCG 3' |
| | PH-6 | 8 3 | 5' GGC GTT ACCACGGTATGATT CATGA 3' |
| | PH-7 | 8 4 | 5' AATGCCTACCAAGCCTGCGATCT 3' |
| | PH-8 | 8 5 | 5' TATCGGAAGATGAAAGTGC GGG ACT 3' |

【0052】

表9 腸球菌株検出用プローブ

| 微生物名 | Probe No. | 配列番号 | 配列 |
|------|-----------|------|----------------------------------|
| 腸球菌 | PI-1 | 8 6 | 5' CAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGA 3' |
| | PI-2 | 8 7 | 5' GGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAAC 3' |
| | PI-3 | 8 8 | 5' GGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAA 3' |
| | PI-4 | 8 9 | 5' GCGGTCTGTCAAGTCGGATGTG 3' |
| | PI-5 | 9 0 | 5' ATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCT 3' |
| | PI-6 | 9 1 | 5' TAACCACAGCAATTGACGTTACCCG 3' |
| | PI-7 | 9 2 | 5' GCAATTGACGTTACCCGAGAAGA 3' |
| | PI-8 | 9 3 | 5' GTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCG 3' |
| | PI-9 | 9 4 | 5' CGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTA 3' |
| | PI-10 | 9 5 | 5' ACCACAGCAATTGACGTTACCCG 3' |
| | PI-11 | 9 6 | 5' GAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAG 3' |
| | PI-12 | 9 7 | 5' AGGCGGTCTGTCAAGTCGGATG 3' |

【0053】

表10 エンテロコッカス フエカリス菌株検出用プローブ

| 微生物名 | Probe No. | 配列番号 | 配列 |
|---------------------|-----------|-------|----------------------------------|
| エンテロコッカ ス フエカリス菌 | PJ-1 | 9 8 | 5' TTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCA 3' |
| | PJ-2 | 9 9 | 5' AACACGTGGGTAACCTACCCATCAG 3' |
| | PJ-3 | 1 0 0 | 5' ATGGCATAAGAGTGAAAGGGCGTT 3' |
| | PJ-4 | 1 0 1 | 5' GACCCGGGTGCATTAGCTAGT 3' |
| | PJ-5 | 1 0 2 | 5' GGACGTTAGTAACTGAACGTCCTCCT 3' |
| | PJ-6 | 1 0 3 | 5' CTCAACCGGGGAGGGTCATTGG 3' |
| | PJ-7 | 1 0 4 | 5' TTGGAGGGTTCCGCCCTCAG 3' |
| | PJ-8 | 1 0 5 | 5' ATAGAGCTTCCCTCGGGGACAAA 3' |
| | PJ-9 | 1 0 6 | 5' CGAGGTCAATCTCTAAAGCTTCT 3' |

【0054】

上記各表中に示したプローブは、DNAマイクロアレイに固定するための官能基として、合成後、定法に従って核酸の5'末端にチオール基を導入した。官能基の導入後、精製し、凍結乾燥した。凍結乾燥したプローブは、-30℃の冷凍庫に保存した。

【0055】

[2. 検体増幅用PCRプライマーの準備]

上記の起炎菌検出用の為の16s rRNA遺伝子（標的遺伝子）増幅用PCR Primerとして以下の表11に示す核酸配列を設計した。具体的には、16s rRNAをコーディングしているゲノム部分を特異的に増幅するプローブセット、つまり約1400～1700塩基長の16srRNAコーディング領域の両端部分で、特異的な融解温度ができるだけ揃えたプライマーを設計した。なお、変異株や、ゲノム上に複数存在する16s rRNAコーディング領域も同時に増幅できるように複数種類のプライマーを設計した。なお、起炎菌の16srRNAコーディング領域に対して共通にはほぼ全長を増幅できるプライマーセットであれば、下記の表11に挙げたプライマーセットに限定する必要はないのは言うまでもない。

【0056】

表11

| | Primer No. | 配列番号 | 配列 |
|-------------------|------------|------|-------------------------------|
| Forward Primer | F-1 | 107 | 5' GCGGCGTGCCTAATACATGCAAG 3' |
| | F-2 | 108 | 5' GCGGCAGGCCTAACACATGCAAG 3' |
| | F-3 | 109 | 5' GCGGCAGGCTAACACATGCAAG 3' |
| Reverse Primer | R-1 | 110 | 5' ATCCAGCCGCACCTTCCGATAC 3' |
| | R-2 | 111 | 5' ATCCAACCGCAGGTTCCCCTAC 3' |
| | R-3 | 112 | 5' ATCCAGCCGCAGGTTCCCCTAC 3' |

【0057】

表11中に示したPrimerは、合成後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により精製し、Forward Primerを3種、Reverse Primerを3種を混合し、それぞれのプライマー濃度が、最終濃度10pmol/μlとなるようにTE緩衝液に溶解した。

【0058】

[3. 各起炎菌Genome DNA（モデル検体）の抽出]

[3-1] 微生物の培養 & Genome DNA 抽出の前処理

まず、上記各起炎菌の標準株（黄色ブドウ球菌標準株（ATCC12600）、表皮ブドウ球菌標準株（ATCC14990）、大腸菌標準株（ATCC11775）、肺炎桿菌標準株（ATCC13883）、緑膿菌標準株（ATCC10145）、セラチア菌株、肺炎連鎖球菌標準株、インフルエンザ菌株、腸球菌標準株（ATCC13047）、エンテロコッカス フエカリス菌標準株（ATCC19433））を定法に従って培養し、微生物培養液を生成した。これらの微生物培養液のそれを1.5ml容量のマイクロチューブに1.0ml (OD₆₀₀=0.7) 採取し、遠心分離で菌体を回収した(8500rpm、5min、4°C)。次に、上精を捨てた後、Enzyme Buffer (50mM Tris-HCl : p.H. 8.0、25mM EDTA) 300μlを加え、ミキサーを用いて再懸濁した。再懸濁した菌液は、再度、遠心分離で菌体を回収した(8500rpm、5min、4°C)。上精を捨てた後、回収された菌体に、以下の酵素溶液を加え、ミキサーを用いて再懸濁した。

【0059】

Lysozyme 50 μl (20 mg/ml in Enzyme Buffer)

N-Acetyl muramidase SG 50 μl (0.2 mg/ml in Enzyme Buffer)。

【0060】

次に、酵素溶液を加え再懸濁した菌液を、37°Cのインキュベーター内で30分間静置し、細胞壁の溶解処理を行った。

【0061】

[3-2] Genome抽出

以下に示す微生物のGenome DNA抽出は、核酸精製キット（MagExtractor-Genome- : TOYO BO社製）を用いて行った。

【0062】

具体的には、まず、前処理した微生物懸濁液に溶解・吸着液750μlと磁性ビーズ40μlを加え、チューブミキサーを用いて、10分間激しく攪拌した（ステップ1）。

次に、分離用スタンド（Magical Trapper）にマイクロチューブをセットし、30秒間静置して磁性粒子をチューブの壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を捨てた（ステップ2）。

次に、洗浄液900μlを加え、ミキサーで5sec程度攪拌して再懸濁を行った（ステップ3）。

次に、分離用スタンド（Magical Trapper）にマイクロチューブをセットし、30秒間静置して磁性粒子をチューブの壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を捨てた（ステップ4）。

【0063】

上記ステップ3、4を繰り返して2度目の洗浄を行なう（ステップ5）。その後、70%エタノール900μlを加え、ミキサーで5sec程度攪拌して再懸濁した（ステップ6）。

次に、分離用スタンド（Magical Trapper）にマイクロチューブをセットし、30秒間静置して磁性粒子をチューブの壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を捨てた（ステップ7）。

ステップ6、7を繰り返して70%エタノールによる2度目の洗浄（ステップ8）を行った後、回収された磁性粒子に純水100μlを加え、チューブミキサーで10分間攪拌を行った（ステップ9）。

次に分離用スタンド（Magical Trapper）にマイクロチューブをセットし、30sec静置して磁性粒子をチューブ壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を新しいチューブに回収した。

【0064】

[3-3] 回収したGenome DNAの検査

回収された微生物（各起炎菌株）のGenome DNAは、定法に従って、アガロース電気泳動と260/280nmの吸光度測定を行い、その品質（低分子核酸の混入量、分解の程度）と回収量を検定した。本実施例では、それぞれの菌において、約9~10μgのGenome DNAが回収され、Genome DNAのデグラデーションやrRNAの混入は認められなかった。回収したGenome DNAは、最終濃度50ng/μlとなるようにTE緩衝液に溶解し、以下の実施例に使用した。

【0065】

[4. DNAマイクロアレイの作製]

DNAマイクロアレイを、特開平11-187900号公報に開示された方法に従って用意した。

[4-1] ガラス基板の洗浄

合成石英のガラス基板（サイズ：25mm×75mm×1mm、飯山特殊ガラス社製）を耐熱、耐アルカリのラックに入れ、所定の濃度に調製した超音波洗浄用の洗浄液に浸した。一晩洗浄液中で浸した後、20分間超音波洗浄を行った。続いて基板を取り出し、軽く純水ですすいだ後、超純水中で20分超音波洗浄をおこなった。次に80℃に加熱した1N水酸化ナトリウム水溶液中に10分間基板を浸した。再び純水洗浄と超純水洗浄を行い、DNAマイクロアレイ用の石英ガラス基板を用意した。

【0066】

[4-2] 表面処理

シランカップリング剤KBM-603（信越シリコーン社製）を、1%の濃度となるように純水中に溶解させ、2時間室温で攪拌した。続いて、先に洗浄したガラス基板をシランカップリング剤水溶液に浸し、20分間室温で放置した。ガラス基板を引き上げ、軽く純水で表面を洗浄した後、窒素ガスを基板の両面に吹き付けて乾燥させた。次に乾燥した基板を120℃に加熱したオーブン中で1時間ベークし、カップリング剤処理を完結させ、基板表面にアミノ基を導入した。次いで同仁化学研究所社製のN-マレイミドカプロイロキシスク

シイミド (N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimido) (以下EMCSと略す) を、ジメチルスルホキシドとエタノールの1:1混合溶媒中に最終濃度が0.3mg/mlとなるように溶解したEMCS溶液を用意した。

【0067】

ピークの終了したガラス基板を放冷し、調製したEMCS溶液中に室温で2時間浸した。この処理により、シランカップリング剤によって表面に導入されたアミノ基とEMCSのスクシイミド基が反応し、ガラス基板表面にマレイミド基が導入された。EMCS溶液から引き上げたガラス基板を、先述のEMCSを溶解した混合溶媒を用いて洗浄し、さらにエタノールにより洗浄した後、窒素ガス雰囲気下で乾燥させた。

【0068】

[4-3] プローブDNA

実施例1で作製した微生物検出用プローブを純水に溶解し、それぞれ、最終濃度（インク溶解時）10μMとなるように分注した後、凍結乾燥を行い、水分を除いた。

【0069】

[4-4] BJプリンタによるDNA吐出、および基板への結合

グリセリン7.5wt%、チオジグリコール7.5wt%、尿素7.5wt%、アセチレノールEH（川研ファインケミカル社製）1.0wt%を含む水溶液を用意した。続いて、先に用意した7種類のプローブ（表1）の夫々を上記の混合溶媒に規定濃度なるように溶解した。得られたDNA溶液をバブルジェット（登録商標）プリンタ（商品名：BJF-850 キヤノン社製）用インクタンクに充填し、印字ヘッドに装着した。

【0070】

なおここで用いたバブルジェット（登録商標）プリンタは平板への印刷が可能なように改造を施したものである。またこのバブルジェット（登録商標）プリンタは、所定のファイル作成方法に従って印字パターンを入力することにより、約5ピコリットルのDNA溶液を約120μmピッチでスポットティングすることが可能となっている。

【0071】

続いて、この改造バブルジェット（登録商標）プリンタを用いて、1枚のガラス基板に対して、印字操作を行い、DNAマイクロアレイを作製した。印字が確実に行われていることを確認した後、30分間加湿チャンバー内に静置し、ガラス基板表面のマレイミド基と核酸プローブ末端のチオール基とを反応させた。

【0072】

[4-5] 洗浄

30分間の反応後、100mMのNaClを含む10mMのリン酸緩衝液(pH7.0)により表面に残ったDNA溶液を洗い流し、ガラス基板表面に一本鎖DNAが固定した遺伝子チップ（DNAマイクロアレイ）を得た。

【0073】

[5. 検体の増幅と標識化（PCR増幅&蛍光標識の取り込み）]

検体となる微生物遺伝子の増幅、および、標識化反応を以下に示す。

【0074】

| | |
|-----------------------------|-------------------------|
| Premix PCR 試薬(TAKARA ExTaq) | 25 μl |
| Template Genome DNA | 2 μl (100ng) |
| Forward Primer mix | 2 μl (20pmol/tube each) |
| Reverse Primer mix | 2 μl (20pmol/tube each) |
| Cy-3 dUTP (1mM) | 2 μl (2nmol/tube) |
| H ₂ O | 17 μl |
| Total | 50 μl |

【0075】

上記組成の反応液を以下のプロトコールに従って、市販のサーマルサイクラーで増幅反

応を行った。

【0076】

| | | |
|------|---------|-----------|
| 95°C | 10 min. | |
| 92°C | 45 sec. | ← |
| 55°C | 45 sec. | 35 Cycles |
| 72°C | 45 sec. | → |
| 72°C | 10 min. | |

【0077】

反応終了後、精製用カラム（QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit）を用いてPrimerを除去（精製）した後、増幅産物の定量を行い、標識化検体とした。

【0078】

[6. ハイブリダイゼーション]

上述の〔4. DNAマイクロアレイの作製〕で作製した遺伝子チップと〔5. 検体の増幅と標識化（PCR増幅&蛍光標識の取り込み）〕で作製した標識化検体を用いて検出反応を行った。

【0079】

[6-1] DNAマイクロアレイのプロッキング

BSA（牛血清アルブミンFraction V: Sigma社製）を1wt%となるように100mM NaCl/10mM Phosphate Bufferに溶解し、この溶液に〔4. DNAマイクロアレイの作製〕で作製した遺伝子チップを室温で2時間浸し、プロッキングを行った。プロッキング終了後、0.1wt% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）を含む2xSSC溶液(NaCl 300mM、Sodium Citrate (trisodium citrate dihydrate, C₆H₅Na₃ · 2H₂O) 30mM、pH 7.0)で洗浄を行った後、純水でリヌスしてからスピンドライ装置で水切りを行った。

【0080】

[6-2] ハイブリダイゼーション

水切りした遺伝子チップをハイブリダイゼーション装置（Genomic Solutions Inc. Hybridization Station）にセットし、以下に示すハイブリダイゼーション溶液、条件でハイブリダイゼーション反応を行った。

【0081】

[6-3] ハイブリダイゼーション溶液

6xSSPE / 10% Formamide / Target(2nd PCR Products 全量)
(6xSSPE: NaCl 900mM、NaH₂PO₄ · H₂O 60mM、EDTA 6mM、p.H. 7.4)。

【0082】

[6-4] ハイブリダイゼーション条件

65°C 3min → 92°C 2min → 45°C 3hr → Wash 2xSSC/ 0.1% SDS at 25°C
→ Wash 2xSSC at 20°C → (Rinse with H₂O : Manual) → Spin dry (65°Cで3分、92度で2分、45°Cで3時間ハイブリダイゼーション反応させた後、2xSSC/ 0.1% SDS、25°Cで洗浄、2xSSC、20°Cで洗浄後、純水でリヌスしスピンドライした)。

【0083】

[7. 微生物の検出（蛍光測定）]

上記ハイブリダイゼーション反応終了後の遺伝子チップを遺伝子チップ用蛍光検出装置(Axon社製、GenePix 4000B)を用いて蛍光測定を行った。その結果、以下の表12～21に示すように、各菌において、再現性良く、十分なシグナルで各菌を検出することができた。また、他の菌のプローブに対するハイブリッド体は検出されなかった。

【0084】

なお、本実施例では、2回ずつ蛍光測定を実施しており、それぞれの結果を以下に示し

た。

【0085】

表12 黄色ブドウ球菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|---------------------------------|------|-------|------|-------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PA-1 | 5' GAACCGCATGGTCAAAAGTGAAAGA 3' | 3000 | 42.9 | 2900 | 40.8 |
| PA-2 | 5' CACTTATAGATGGATCCGCGCTGC 3' | 7700 | 110.0 | 7700 | 108.5 |
| PA-3 | 5' TGCACATCTTGACGGTACCTAACAG 3' | 6400 | 91.4 | 6400 | 90.1 |
| PA-4 | 5' CCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG 3' | 2500 | 35.7 | 2500 | 35.2 |
| PA-5 | 5' AATACAAAGGGCAGCGAAACCGC 3' | 7800 | 111.4 | 7800 | 109.9 |
| PA-6 | 5' CCCGTGGAGTAACCTTTAGGAGCT 3' | 4800 | 68.6 | 4800 | 67.6 |
| PA-7 | 5' TAACCTTTAGGAGCTAGCCGTCGA 3' | 4500 | 64.3 | 4300 | 60.6 |
| PA-8 | 5' TTTAGGAGCTAGCCGTCGAAGGT 3' | 4800 | 68.6 | 4800 | 67.6 |
| PA-9 | 5' TAGCCGTCGAAGGTGGGACAAAT 3' | 5300 | 75.7 | 5200 | 73.2 |

【0086】

表13 表皮ブドウ球菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|----------------------------------|------|------|------|------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PB-1 | 5' GAACAGACCGAGGAGCTTGCTCC 3' | 1000 | 14.5 | 1100 | 15.7 |
| PB-2 | 5' TAGTGAAGACGGTTTGCTGTCACT 3' | 1800 | 26.1 | 1800 | 25.7 |
| PB-3 | 5' TAAGTAACATATGCACGTCTGACGGT 3' | 1400 | 20.3 | 1400 | 20 |
| PB-4 | 5' GACCCCTCTAGAGATAGAGTTCCC 3' | 1000 | 14.5 | 1100 | 15.7 |
| PB-5 | 5' AGTAACCATTGGAGCTAGCCGTC 3' | 1800 | 26.1 | 2000 | 28.6 |
| PB-6 | 5' GAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGC 3' | 1200 | 17.4 | 1300 | 18.6 |
| PB-7 | 5' AGCCGGTGGAGTAACCATTGG 3' | 1100 | 15.9 | 1100 | 15.7 |

【0087】

表14 大腸菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|----------------------------------|----------|------|------|------|
| | | 蛍光 輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PC-1 | 5' CTCTGCCATCGGATGTGCCCA 3' | 1200 | 17.6 | 1200 | 17.9 |
| PC-2 | 5' ATACCTTGCTCATTGACGTTACCCG 3' | 1500 | 22.1 | 1600 | 23.9 |
| PC-3 | 5' TTTGCTCATTGACGTTACCCGAG 3' | 1100 | 16.2 | 1200 | 17.9 |
| PC-4 | 5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTACA 3' | 2000 | 29.4 | 2100 | 31.3 |
| PC-5 | 5' ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG 3' | 1500 | 22.1 | 1500 | 22.4 |
| PC-6 | 5' CGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGT 3' | 2400 | 35.3 | 2600 | 38.8 |
| PC-7 | 5' GCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAAT 3' | 1200 | 17.6 | 1200 | 17.9 |

【0088】

表15 肺炎桿菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|----------------------------------|------|------|------|------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PD-1 | 5' TAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGG 3' | 500 | 7.6 | 600 | 9 |
| PD-2 | 5' TCATGCCATCAGATGTGCCAGA 3' | 600 | 9.1 | 600 | 9 |
| PD-3 | 5' CGGGGAGGAAGGCATAAGGTTAAT 3' | 700 | 10.6 | 700 | 10.4 |
| PD-4 | 5' TTCGATTGACGTTACCCGAGAAGA 3' | 1000 | 15.2 | 1200 | 17.9 |
| PD-5 | 5' GGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCC 3' | 2700 | 40.9 | 2700 | 40.3 |
| PD-6 | 5' GCAGGCTAGAGTCTTAGAGGGG 3' | 3400 | 51.5 | 3300 | 49.3 |

【0089】

表16 緑膿菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|---------------------------------|------|------|------|------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PE-1 | 5' TGAGGGAGAAAGTGGGGATCTC 3' | 3500 | 50.0 | 3600 | 50 |
| PE-2 | 5' TCAGATGAGCCTAGGTGGATTAGC 3' | 1600 | 22.9 | 1400 | 19.4 |
| PE-3 | 5' GAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGG 3' | 3500 | 50.0 | 3400 | 47.2 |
| PE-4 | 5' GTACGGTAGAGGGTGGTGGATT 3' | 3100 | 44.3 | 3100 | 43.1 |
| PE-5 | 5' GACCACCTGGACTGATACTGACAC 3' | 1600 | 22.9 | 1600 | 22.2 |
| PE-6 | 5' TGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTC 3' | 1200 | 17.1 | 1200 | 16.7 |
| PE-7 | 5' TTAGTTACCAAGCACCTCGGGTGG 3' | 1000 | 14.3 | 1200 | 16.7 |
| PE-8 | 5' TAGTCTAACCGCAAGGGGGACG 3' | 1100 | 15.7 | 1100 | 15.3 |

【0090】

表17 セラチア菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|----------------------------------|------|------|------|------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PF-1 | 5' TAGCACAGGGAGCTTGCTCCCT 3' | 600 | 8.8 | 600 | 8.7 |
| PF-2 | 5' AGGTGGTGAGCTTAATACGCTCATC 3' | 700 | 10.3 | 600 | 8.7 |
| PF-3 | 5' TCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAG 3' | 2000 | 29.4 | 2200 | 31.9 |
| PF-4 | 5' ACTGCATTGAAACTGGCAAGCTAGA 3' | 2800 | 41.2 | 2700 | 39.1 |
| PF-5 | 5' TTATCCTTGTGAGCTTCGGCC 3' | 700 | 10.3 | 700 | 10.1 |
| PF-6 | 5' ACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGG 3' | 3400 | 50.0 | 3300 | 47.8 |

【0091】

表18 肺炎連鎖球菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|----------------------------------|------|------|------|------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PG-1 | 5' AGTAGAACGCTGAAGGAGGAGCTTG 3' | 1000 | 14.9 | 1100 | 16.2 |
| PG-2 | 5' CTTGCATCACTACCAGATGGACCTG 3' | 1200 | 17.9 | 1300 | 19.1 |
| PG-3 | 5' TGAGAGTGGAAAGTTCACACTGTGAC 3' | 1000 | 14.9 | 1100 | 16.2 |
| PG-4 | 5' GCTGTGGCTTAACCATAGTAGGCTTT 3' | 1800 | 26.9 | 1900 | 27.9 |
| PG-5 | 5' AAGCGGCTCTGGCTTGTAACT 3' | 1300 | 19.4 | 1500 | 22.1 |
| PG-6 | 5' TAGACCCTTCCGGGGTTAGTGC 3' | 1300 | 19.4 | 1300 | 19.1 |
| PG-7 | 5' GACGGCAAGCTAATCTCTTAAAGCCA 3' | 2000 | 29.9 | 2100 | 30.9 |

【0092】

表19 インフルエンザ菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|-------------------------------------|------|------|------|------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PH-1 | 5' GCTTGGGAATCTGGCTTATGGAGG 3' | 3500 | 50.0 | 3600 | 50 |
| PH-2 | 5' TGCCATAGGATGAGCCCCAAGTGG 3' | 600 | 8.8 | 700 | 10.1 |
| PH-3 | 5' CTTGGGAATGTACTGACGCTCATGTG 3' | 600 | 8.8 | 600 | 8.7 |
| PH-4 | 5' GGATTGGGCTTAGAGCTTGGTGC 3' | 1100 | 16.2 | 1200 | 17.4 |
| PH-5 | 5' TACAGAGGGAAGCGAAGCTGCG 3' | 700 | 10.3 | 600 | 8.7 |
| PH-6 | 5' GGC GTTT ACCACGGTATGATT CATGA 3' | 1300 | 19.1 | 1300 | 18.8 |
| PH-7 | 5' AATGCCTACCAAGCCTGCGATCT 3' | 2100 | 30.9 | 2200 | 31.9 |
| PH-8 | 5' TATCGGAAGATGAAAGTGC GGGACT 3' | 700 | 10.3 | 600 | 8.7 |

【0093】

表20 腸球菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|-----------------------------------|------|-------|------|-------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PI-1 | 5' CAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGA 3' | 2100 | 29.2 | 2200 | 31 |
| PI-2 | 5' GGGAGGAAGGTGTTGGTTAACAAAC 3' | 7900 | 109.7 | 7900 | 111.3 |
| PI-3 | 5' GGTGTTGGTTAACAAACACAGCAA 3' | 1000 | 13.9 | 1300 | 18.3 |
| PI-4 | 5' GCGGTCTGTCAAGTCGGATGTG 3' | 6400 | 88.9 | 6400 | 90.1 |
| PI-5 | 5' ATT CGAA ACTGGCAGGCTAGAGTCT 3' | 9400 | 130.6 | 9200 | 129.6 |
| PI-6 | 5' TAACCACAGCAATTGACGTTACCCG 3' | 4700 | 65.3 | 4800 | 67.6 |
| PI-7 | 5' GCAATTGACGTTACCCGAGAAGA 3' | 4600 | 63.9 | 4500 | 63.4 |

【0094】

表21 エンテロコッカス フェカリス菌株検出用プローブの蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|----------------------------------|------|------|------|------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PJ-1 | 5' TTCTTCCTCCCGAGTGCTTGCA 3' | 1500 | 22.1 | 1500 | 20.8 |
| PJ-2 | 5' AACACGTGGGTAACCTACCCATCAG 3' | 2400 | 35.3 | 2700 | 37.5 |
| PJ-3 | 5' ATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTT 3' | 5600 | 82.4 | 5600 | 77.8 |
| PJ-4 | 5' GACCCGCGGTGCATTAGCTAGT 3' | 2300 | 33.8 | 2300 | 31.9 |
| PJ-5 | 5' GGACGTTAGTAACGTAAACGTCCCCT 3' | 1000 | 14.7 | 1400 | 19.4 |
| PJ-6 | 5' CTCAACCAGGGAGGGTCATTGG 3' | 4400 | 64.7 | 4400 | 61.1 |
| PJ-7 | 5' TTGGAGGGTTCCGCCCTTCAG 3' | 1700 | 25 | 1800 | 25 |

【0095】

表12～21の蛍光輝度の数値（フォトマル電圧400V）は、ピクセル平均輝度（解像度5μm）を示した。また、S/N比は、測定機付属の解析ソフト（Axon社製、GenePixPro Ver.3.0）で測定したバックグラウンド平均値で蛍光輝度を除したものを示した。

【0096】

表12～21で明らかなように、再現性良く、十分なシグナルで各起炎菌を検出することができる。

【0097】

<実施例2> 2 Step PCR法を用いた微生物の検出

実施例1同様に、プローブDNA、検体增幅用PCRプライマー、各起炎菌のGenome DNA、DNAマイクロアレイを用意し、以下の実験を行った。

【0098】

[1. 検体の増幅と標識化（PCR増幅&蛍光標識の取り込み）]

検体となる微生物遺伝子の増幅（1st PCR）、および、標識化（2ndPCR）反応を以下に示す。

【0099】

[2. 増幅反応液組成：1st PCR]

【0100】

| | |
|------------------------------|-------------------------|
| Premix PCR 試薬 (TAKARA ExTaq) | 25 μl |
| Template Genome DNA | 2 μl (10ng) |
| Forward Primer mix | 2 μl (20pmol/tube each) |
| Reverse Primer mix | 2 μl (20pmol/tube each) |
| H ₂ O | 19 μl |
| Total | 50 μl |

【0101】

上記組成の反応液を以下のプロトコールに従って、市販のサーマルサイクラーで増幅反応を行った。

【0102】

95°C 10 min.
 92°C 45 sec. ←
 55°C 45 sec. 25 Cycles
 72°C 45 sec. —
 72°C 10 min.

【0103】

反応終了後、精製用カラム (QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit) を用いて精製した後、増幅産物の定量を行った。

【0104】

[3. 標識化反応液組成：2nd PCR]

【0105】

| | | |
|---|---------|--------------------|
| Enzyme (QIAGEN Hotstar Taq Polymerase) | 0.5 μl | (2.5u) |
| Template DNA (1st PCR Product) | 10 μl | (30ng) |
| dNTP mix (Low dTTP)* | 2 μl | |
| Cy-3 dUTP (1mM) | 2 μl | (2nmol/tube) |
| Reverse Primer mix | 5 μl | (50pmol/tube each) |
| 10 x Buffer | 5 μl | |
| H ₂ O | 25.5 μl | |
| Total | 50 μl | |

*dNTP mix (Low dTTP) :

dATP, dCTP, dGTP / 5mM (final : 10 nmol/tube)

dTTP / 4mM (final : 8 nmol/tube)

【0106】

上記組成の反応液を以下のプロトコールに従って、市販のサーマルサイクラーで増幅反応を行った。

【0107】

95°C 10 min.
 92°C 45 sec. ←
 55°C 45 sec. 25 Cycles
 72°C 45 sec. —
 72°C 10 min.

【0108】

反応終了後、精製用カラム (QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit) を用いて精製し、標識化検体とした。

【0109】

[4. ハイブリダイゼーション]

実施例1と同様に行った。

【0110】

[5. 微生物の検出（蛍光測定）]

ハイブリダイゼーション反応終了後のDNAマイクロアレイをDNAマイクロアレイ用蛍光検出装置（Axon社製、GenePix 4000B）を用いて蛍光測定を行った。測定結果を表2 2～3 1に示す。

【0111】

なお、本実施例においても、2回ずつ蛍光測定を実施し、それぞれの結果を表2 2～3 1に示した。

【0112】

表2 2 黄色ブドウ球菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PA-1 | 5' GAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGA 3' | 14000 | 186.7 | 13000 | 173.3 |
| PA-2 | 5' CACTTATAGATGGATCCGCGCTGC 3' | 36000 | 480 | 35000 | 466.7 |
| PA-3 | 5' TGCACATCTTGACGGTACCTAACAG 3' | 31000 | 413.3 | 29000 | 386.7 |
| PA-4 | 5' CCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG 3' | 10000 | 133.3 | 10000 | 133.3 |
| PA-5 | 5' AATACAAAGGGCAGCGAAACCGC 3' | 39000 | 520 | 38500 | 513.3 |
| PA-6 | 5' CCGGTGGAGTAACCTTTAGGAGCT 3' | 22000 | 293.3 | 22100 | 294.7 |
| PA-7 | 5' TAACCTTTAGGAGCTAGCCGTCGA 3' | 22000 | 293.3 | 21800 | 290.7 |
| PA-8 | 5' TTTAGGAGCTAGCCGTCGAAGGT 3' | 25000 | 333.3 | 24000 | 320 |
| PA-9 | 5' TAGCCGTCGAAGGTGGGACAAAT 3' | 26000 | 346.7 | 25500 | 340 |

【0113】

表2 3 表皮ブドウ球菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|---------------------------------|------|-------|------|-------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PB-1 | 5' GAACAGACGAGGAGCTTGCTCC 3' | 4500 | 62.5 | 4700 | 67.1 |
| PB-2 | 5' TAGTGAAAGACGGTTTGCTGTCACT 3' | 9000 | 125 | 8900 | 127.1 |
| PB-3 | 5' TAAGTAACTATGCACGTCTGACGGT 3' | 7100 | 98.6 | 7300 | 104.3 |
| PB-4 | 5' GACCCCTCTAGAGATAGAGTTTCCC 3' | 4800 | 66.7 | 5200 | 74.3 |
| PB-5 | 5' AGTAACCATTGGAGCTAGCCGTC 3' | 9100 | 126.4 | 9300 | 132.9 |
| PB-6 | 5' GAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGC 3' | 5800 | 80.6 | 6300 | 90 |
| PB-7 | 5' AGCCGGTGGAGTAACCATTGG 3' | 5400 | 75 | 5500 | 78.6 |

【0114】

表24 大腸菌の蛍光測定結果

| Probe N o. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|---------------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PC-1 | 5' CTCTGCCATCGGATGTGCCCA 3' | 5600 | 76.7 | 6200 | 83.8 |
| PC-2 | 5' ATACCTTGCTCATTGACGTTACCCG 3' | 7600 | 104.1 | 7500 | 101.4 |
| PC-3 | 5' TTTGCTCATTGACGTTACCCGAG 3' | 5600 | 76.7 | 5700 | 77 |
| PC-4 | 5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGA 3' | 9400 | 128.8 | 9300 | 125.7 |
| PC-5 | 5' ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG 3' | 7200 | 98.6 | 7200 | 97.3 |
| PC-6 | 5' CGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGT 3' | 11500 | 157.5 | 11500 | 155.4 |
| PC-7 | 5' GCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAAT 3' | 5600 | 76.7 | 5500 | 74.3 |

【0115】

表25 肺炎桿菌の蛍光測定結果

| Probe N o. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|---------------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PD-1 | 5' TAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGG 3' | 2000 | 28.6 | 2100 | 30 |
| PD-2 | 5' TCATGCCATCAGATGTGCCAGA 3' | 2500 | 35.7 | 2600 | 37.1 |
| PD-3 | 5' CGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAAT 3' | 2900 | 41.4 | 2900 | 41.4 |
| PD-4 | 5' TTGCGATTGACGTTACCCGAGAAGA 3' | 4500 | 64.3 | 4700 | 67.1 |
| PD-5 | 5' GGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCC 3' | 9900 | 141.4 | 10100 | 144.3 |
| PD-6 | 5' GCAGGCTAGAGTCTTAGAGGGG 3' | 13000 | 185.7 | 13400 | 191.4 |

【0116】

表26 緑膿菌の蛍光測定結果

| Probe N o. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|---------------|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PE-1 | 5' TGAGGGAGAAAGTGGGGATCTTC 3' | 17000 | 239.4 | 17300 | 240.3 |
| PE-2 | 5' TCAGATGAGCCTAGGTGGATTAGC 3' | 8300 | 116.9 | 8600 | 119.4 |
| PE-3 | 5' GAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGG 3' | 17400 | 245.1 | 17000 | 236.1 |
| PE-4 | 5' GTACGGTAGAGGGTGGATTTC 3' | 15000 | 211.3 | 16000 | 222.2 |
| PE-5 | 5' GACCACCTGGACTGATACTGACAC 3' | 8000 | 112.7 | 8300 | 115.3 |
| PE-6 | 5' TGGCCTTGACATGCTGAGAACTTC 3' | 5400 | 76.1 | 5800 | 80.6 |
| PE-7 | 5' TTAGTTACCAGCACCTGGGTGG 3' | 5300 | 74.6 | 5100 | 70.8 |
| PE-8 | 5' TAGTCTAACCGCAAGGGGGACG 3' | 5400 | 76.1 | 5000 | 69.4 |

【0117】

表27 セラチア菌の蛍光測定結果

| Probe N o. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|---------------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PF-1 | 5' TAGCACAGGGAGCTTGCTCCCT 3' | 3100 | 43.7 | 3300 | 45.2 |
| PF-2 | 5' AGGTGGTGAGCTTAATACGCTCATC 3' | 3300 | 46.5 | 3200 | 43.8 |
| PF-3 | 5' TCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAG 3' | 10100 | 142.3 | 10000 | 137 |
| PF-4 | 5' ACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGA 3' | 12000 | 169 | 11800 | 161.6 |
| PF-5 | 5' TTATCCTTGTGAGCTTCGGCC 3' | 4100 | 57.7 | 4200 | 57.5 |
| PF-6 | 5' ACTTCAGCGAGGAGGAAGGTGG 3' | 14300 | 201.4 | 14300 | 195.9 |

【0118】

表28 肺炎連鎖球菌の蛍光測定結果

| Probe N o. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|---------------|----------------------------------|-------|-------|------|-------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PG-1 | 5' AGTAGAACGCTGAAGGAGGAGCTTG 3' | 4500 | 63.4 | 4300 | 60.6 |
| PG-2 | 5' CTTGCATCACTACCAGATGGACCTG 3' | 5800 | 81.7 | 5600 | 78.9 |
| PG-3 | 5' TGAGAGTGGAAAGTTCACACTGTGAC 3' | 5000 | 70.4 | 4900 | 69 |
| PG-4 | 5' GCTGTGGCTTAACCATAGTAGGCTT 3' | 8700 | 122.5 | 8800 | 123.9 |
| PG-5 | 5' AAGCGGCTCTGGCTTGTAAC 3' | 7200 | 101.4 | 7300 | 102.8 |
| PG-6 | 5' TAGACCCTTCCGGGTTAGTGC 3' | 6700 | 94.4 | 7000 | 98.6 |
| PG-7 | 5' GACGGCAAGCTAATCTCTAAAGCCA 3' | 10200 | 143.7 | 9900 | 139.4 |

【0119】

表29 インフルエンザ菌の蛍光測定結果

| Probe N o. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|---------------|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PH-1 | 5' GCTTGGGAATCTGGCTTATGGAGG 3' | 3100 | 44.3 | 3200 | 45.1 |
| PH-2 | 5' TGCCATAGGATGAGCCCAAGTGG 3' | 3200 | 45.7 | 3200 | 45.1 |
| PH-3 | 5' CTTGGGAATGTACTGACGCTCATGTG 3' | 4900 | 70 | 5600 | 78.9 |
| PH-4 | 5' GGATTGGGCTTAGAGCTTGGTGC 3' | 3900 | 55.7 | 3800 | 53.5 |
| PH-5 | 5' TACAGAGGGAAGCGAAGCTGCG 3' | 6700 | 95.7 | 6500 | 91.5 |
| PH-6 | 5' GGC GTT ACCACGGTATGATT CATGA 3' | 10200 | 145.7 | 11000 | 154.9 |
| PH-7 | 5' AATGCCTACCAAGCCTGCGATCT 3' | 4200 | 60 | 4100 | 57.7 |
| PH-8 | 5' TATCGGAAGATGAAAGTGCAGGACT 3' | 3200 | 45.7 | 3500 | 49.3 |

【0120】

表30 腸球菌の蛍光測定結果

| Probe N o. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|---------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PI-1 | 5' CAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGA 3' | 10000 | 133.3 | 9900 | 133.8 |
| PI-2 | 5' GGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAACAAAC 3' | 38000 | 506.7 | 38000 | 513.5 |
| PI-3 | 5' GGTGTTGTGGTTAACAAACACAGCAA 3' | 4700 | 62.7 | 4700 | 63.5 |
| PI-4 | 5' GCGGTCTGTCAAGTCGGATGTG 3' | 31000 | 413.3 | 32000 | 432.4 |
| PI-5 | 5' ATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCT 3' | 47500 | 633.3 | 45000 | 608.1 |
| PI-6 | 5' TAACCACAGCAATTGACGTTACCCG 3' | 23600 | 314.7 | 24000 | 324.3 |
| PI-7 | 5' GCAATTGACGTTACCCGAGAAGA 3' | 21500 | 286.7 | 22700 | 306.8 |

【0121】

表31 エンテロコッカス フェカリス菌株検出用プローブの蛍光測定結果

| Probe N o. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|---------------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PJ-1 | 5' TTCTTCCCTCCCGAGTGCTTGCA 3' | 7000 | 98.6 | 7300 | 101.4 |
| PJ-2 | 5' AACACGTGGTAACCTACCCATCAG 3' | 12300 | 173.2 | 12000 | 166.7 |
| PJ-3 | 5' ATGGCATAAGAGTGAAAGGCCTT 3' | 25000 | 352.1 | 27400 | 380.6 |
| PJ-4 | 5' GACCCGCGGTGCATTAGCTAGT 3' | 10000 | 140.8 | 11000 | 152.8 |
| PJ-5 | 5' GGACGTTAGTAACGTAAACGTCCCCT 3' | 5600 | 78.9 | 5200 | 72.2 |
| PJ-6 | 5' CTCAACCGGGGAGGGTCATTGG 3' | 22100 | 311.3 | 22200 | 308.3 |
| PJ-7 | 5' TTGGAGGGTTCCGCCCTTCAG 3' | 8800 | 123.9 | 9000 | 125 |

【0122】

表22～31の蛍光輝度の数値（フォトマル電圧400V）は、ピクセル平均輝度（解像度5μm）を示した。また、S/N比は、測定機付属の解析ソフト（Axon社製、GenePixPro Version 3.0）で測定したバックグラウンド平均値で蛍光輝度を除したものと示した。

【0123】

表22～31で明らかのように、再現性良く、十分なシグナルで各種起炎菌を検出することができる。

【0124】

＜実施例3＞ 2 Step PCR法を用いた微生物の検出

実施例1、2同様に、プローブDNA、検体增幅用PCRプライマー、各起炎菌のGenome DNA、DNAマイクロアレイを用意し、以下の実験を行った。

【0125】

[1. 検体の増幅と標識化（蛍光標識付きPCRプライマーの使用）]

検体となる微生物遺伝子の増幅（1st PCR）、および、標識化（2nd PCR）反応を以下に示す。

【0126】

[2. 増幅反応液組成；1st PCR]

【0127】

| | |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| AmpliTaq Gold LD(5U/ μ L) | 0.5 μ L |
| Template DNA | variable |
| dNTP mix(2.5mM/each) | 4.0 μ L |
| x10 PCR buffer | 5.0 μ L |
| 25mM MgCl ₂ | 7.0 μ L |
| Forward Primer Mix(10 μ M/each) | 0.25 μ L |
| Reverse Primer Mix(10 μ M/each) | 0.25 μ L |
| H ₂ O | variable |
| Total | 50 μL |

【0128】

上記組成の反応液を以下のプロトコールに従って、市販のサーマルサイクターで増幅反応を行なった。

【0129】

| | |
|------|-------------------|
| 95°C | 10 min. |
| 92°C | 45 sec. ← |
| 67°C | 45 sec. 39 Cycles |
| 72°C | 45 sec. — |
| 72°C | 10 min. |

【0130】

反応終了後、精製用カラム (QIAGEN QIAquick PCR PurificationKit) を用いて精製した後、増幅産物の定量を行なった。

【0131】

[3. 標識化反応組成：2nd PCR]

【0132】

| | |
|----------------------------------|-----------------------------|
| Premix PCR reagent(TAKARA ExTaq) | 25 μ l |
| Template DNA (1st PCR Product) | Variable (30ng/tube) |
| Cy3 Labeled Reverse primer Mix | 5 μ l |
| H ₂ O | Variable |
| Total | 50 μl |

【0133】

上記組成の反応液を以下のプロトコールに従って、市販のサーマルサイクターで増幅反応を行った。

【0134】

| | |
|------|-------------------|
| 95°C | 10 min. |
| 92°C | 45 sec. ← |
| 65°C | 45 sec. 24 Cycles |
| 72°C | 45 sec. — |
| 72°C | 10 min. |

【0135】

反応終了後、精製用カラム（QIAGEN QIAquick PCR PurificationKit）を用いて精製し、標識化検体とした。

【0136】

[4. ハイブリダイゼーション]

実施例1と同様に行った。

【0137】

[5. 微生物の検出（蛍光測定）]

ハイブリダイゼーション反応終了後のDNAマイクロアレイをDNAマイクロアレイ用蛍光検出装置（Axon社製、GenePix 4000B）を用いで蛍光測定を行った。測定結果を表3-2～4-1に示す。

【0138】

なお、本実施例においては、2回ずつ蛍光測定を実施し、それぞれの結果を表3-2～4-1に示した。

【0139】

表3-2 黄色ブドウ球菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PA-10 | 5' ACGGACGAGAAGCTTGCCTCTCT 3' | 247 | 3.4 | 146 | 2.1 |
| PA-11 | 5' TGTCACTTATAGATGGATCCGCGCT 3' | 4177 | 57.9 | 3083 | 43.4 |
| PA-12 | 5' TGTAAGTAACGTGACATCTTGACG 3' | 4686 | 64.9 | 3768 | 53.1 |
| PA-13 | 5' ACAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCC 3' | 2612 | 36.2 | 2709 | 38.2 |
| PA-14 | 5' GTGGAGTAACCTTTAGGAGCTAGCC 3' | 26505 | 367.2 | 17560 | 247.3 |

【0140】

表3-3 表皮ブドウ球菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PB-2 | 5' TAGTGAAGACGGTTTGCTGTCAGT 3' | 7000 | 94.1 | 1800 | 25.7 |
| PB-4 | 5' GACCCCTCTAGAGATAGAGTTTCCC 3' | 3274 | 44.0 | 1100 | 15.7 |
| PB-8 | 5' AGACGAGGAGCTGCTCCTCTG 3' | 111 | 1.5 | 59 | 0.8 |
| PB-9 | 5' AGAACAAATGTGTAAGTAACATGCACGT 3' | 6920 | 93.0 | 4910 | 70.1 |
| PB-10 | 5' ACCATTGGAGCTAGCCGTGCA 3' | 15244 | 205.0 | 18136 | 259.1 |

【0141】

表3-4 大腸菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|------------------------------------|------|------|------|------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PC-4 | 5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGA 3' | 5416 | 74.7 | 2100 | 31.3 |
| PC-8 | 5' TAACAGGAAGAAGCTTGCCTTTGCTG 3' | 160 | 2.2 | 112 | 1.7 |
| PC-9 | 5' TTGCCATCGGATGTGCCAGAT 3' | 4133 | 57.0 | 4581 | 68.4 |
| PC-10 | 5' GGAAGGGAGTAAAGTTAACCTTTGCTC 3' | 4194 | 57.8 | 5349 | 79.8 |
| PC-11 | 5' ATCTTTGTTGCCAGCGGTCCG 3' | 6719 | 92.7 | 2594 | 38.7 |
| PC-12 | 5' AAGGGAGTAAAGTTAACCTTTGCTCATG 3' | 3984 | 58.6 | 4021 | 60.0 |

【0142】

表35 肺炎桿菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|-----------------------------------|-------|------|------|------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PD-7 | 5' TCATGCCATCAGATGTGCCAGAT 3' | 5414 | 40.0 | 4171 | 62.3 |
| PD-8 | 5' CGGGGAGGAAGGCGATAAGTTAA 3' | 4096 | 30.2 | 6227 | 93.0 |
| PD-9 | 5' TTATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGA 3' | 4122 | 30.4 | 3269 | 48.8 |
| PD-10 | 5' CATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTC 3' | 9474 | 70.0 | 6486 | 96.9 |
| PD-11 | 5' CCTTGTGCCAGCGGTTAGGC 3' | 10648 | 78.6 | 2754 | 41.1 |

【0143】

表36 緑膿菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|------------------------------------|------|-------|------|-------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PE-1 | 5' TGAGGGAGAAAGTGGGGATCTTC 3' | 6175 | 82.2 | 3600 | 50.0 |
| PE-6 | 5' TGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTC 3' | 8159 | 108.6 | 1200 | 16.7 |
| PE-7 | 5' TTAGTTACCAGCACCTCGGGTGG 3' | 3277 | 43.6 | 1200 | 16.7 |
| PE-9 | 5' TGCATCCAAAACTACTGAGCTAGAGTAC 3' | 6626 | 88.2 | 7432 | 103.4 |
| PE-10 | 5' GTCGACTAGCCGTTGGGATCCT 3' | 5734 | 76.3 | 3365 | 46.8 |

【0144】

表37 セラチア菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|-----------------------------------|-------|-------|------|------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PF-7 | 5' GGTAGCACAGGGAGCTTGCTC 3' | 4482 | 66.4 | 1040 | 15.1 |
| PF-8 | 5' CGAGGAGGAAGGTGGTGAGCTTAATA 3' | 6362 | 94.2 | 3199 | 46.3 |
| PF-9 | 5' TACGCTCATCAATTGACGTTACTCGC 3' | 4569 | 67.7 | 2884 | 41.8 |
| PF-10 | 5' GAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGA 3' | 7905 | 117.1 | 6786 | 98.3 |
| PF-11 | 5' TTATCCTTGTGCCAGCGGTTCG 3' | 12787 | 189.4 | 3849 | 55.7 |

【0145】

表38 肺炎連鎖球菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|--------------------------------------|-------|------|------|-------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PG-1 | 5' AGTAGAACGCTGAAGGAGGAGCTTG 3' | 10078 | 70.3 | 1100 | 16.2 |
| PG-5 | 5' AAGCGGCTCTGGCTTGTAACT 3' | 4331 | 30.2 | 1500 | 22.1 |
| PG-6 | 5' TAGACCCTTCCGGGTTAGTGC 3' | 4730 | 33.0 | 1300 | 19.1 |
| PG-8 | 5' GACATTGCTTAAAGGTGCAATTGCA 3' | 7128 | 49.7 | 7720 | 113.6 |
| PG-9 | 5' GTTGTAAAGAGAAGAACGAGTGTGAGAGTG 3' | 6665 | 46.5 | 3297 | 48.5 |

【0146】

表39 インフルエンザ菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|--------------------------------|-------|-------|------|------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PH-1 | 5' GCTTGGGAATCTGGCTTATGGAGG 3' | 11106 | 150.3 | 3600 | 50.0 |
| PH-2 | 5' TGCCATAGGATGAGCCCCAAGTGG 3' | 7056 | 95.5 | 700 | 10.1 |
| PH-4 | 5' GGATTGGGCTTAGAGCTTGGTGC 3' | 100 | 1.4 | 1200 | 17.4 |
| PH-5 | 5' TACAGAGGGAAGCGAAGCTGCG 3' | 11237 | 152.1 | 600 | 8.7 |
| PH-7 | 5' AATGCCTACCAAGCCTGCGATCT 3' | 5054 | 68.4 | 2200 | 31.9 |

【0147】

表40 腸球菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|----------------------------------|------|-------|------|------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PI-8 | 5' GTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCG 3' | 2221 | 30.1 | 582 | 8.2 |
| PI-9 | 5' CGGGGAGGAAGGTGTTGGTTA 3' | 5484 | 74.2 | 2193 | 30.9 |
| PI-10 | 5' ACCACAGCAATTGACGTTACCCG 3' | 3325 | 45.0 | 646 | 9.1 |
| PI-11 | 5' GAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAG 3' | 7574 | 102.5 | 3039 | 42.8 |
| PI-12 | 5' AGGCCGTCTGTCAGTCGGATG 3' | 5768 | 78.0 | 5701 | 80.3 |

【0148】

表41 エンテロコッカス フェカリス菌の蛍光測定結果

| Probe No. | 配列 | 1回目 | | 2回目 | |
|-----------|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 蛍光輝度 | S/N比 | 蛍光輝度 | S/N比 |
| PJ-1 | 5' TTCTTCCTCCCGAGTGCTTGCA 3' | 1012 | 14.9 | 1500 | 20.8 |
| PJ-3 | 5' ATGGCATAAGAGTGAAGCGCTT 3' | 4266 | 62.6 | 5600 | 77.8 |
| PJ-5 | 5' GGACGTTAGTAAGTGAACGTCCCCT 3' | 652 | 9.6 | 1400 | 19.4 |
| PJ-8 | 5' ATAGAGCTTCCTTCGGGACAAA 3' | 3232 | 47.5 | 810 | 11.2 |
| PJ-9 | 5' CGAGGTCAATGCAAATCTCTAAAGCTTCT 3' | 11411 | 167.6 | 18776 | 260.7 |

【0149】

表22～31で明らかなように、再現性良く、十分なシグナルで各種起炎菌を検出することができる。

【0150】

以上説明したように、上記実施例によれば、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌、セラチア菌、肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌、腸球菌、及びエンテロコッカス・フェカリス菌の10種菌を検出可能なプローブセットをそれぞれ別々に、或いは組み合わせて固定したマクロアレイを用いて、感染症起炎菌を同定することが可能になり、微生物由来のDNAプローブの問題を解決した。すなわち、オリゴヌクレオチドプローブは、その塩基数の少なさゆえに、化学的に大量合成が可能であり、精製や濃度のコントロールが可能である。また、細菌の種による分類を目的に、同じ種の菌種は一括検出が可能で、しかも、他の種の細菌は区別して検出できるようなプローブセットが提供できた。

【0151】

また、これらの差異がDNAマイクロアレイ上で精度良く評価できるよう、プローブと検体とのハイブリッド体の安定性も考慮したプローブセットを提供することができる。さらにはこれらのプローブDNAと検体との反応を行なう為に、これらのプローブDNAが固定された担体を提供することができる。このプローブ及びプローブセットと検体溶液と

を反応せしめる過程で、これらのプローブDNAが安定に担体上に固定され、再現性の高い検出結果を得るために、化学的に固定された担体を提供することができる。

【0152】

また、上記実施形態によれば、感染症起炎菌遺伝子の16s rRNA遺伝子配列を過不足なく検出することにより、該感染症起炎菌の存在を効率良く、また高い精度で判定することができる。

【0153】

<実施例4> プライマーセットについて

上記実施例において、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、大腸菌、肺炎桿菌、綠膿菌、セラチア菌、肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌、エンテロバクター・クロアカエ菌、及びエンテロコッカス・フェカリス菌のいずれか、或いは複数の16s rRNA遺伝子配列を増幅するのに用いられたプライマーセット（表11）を説明する。

【0154】

本実施形態のプライマーセットは、感染症起炎菌同定のために行なわれるPCR反応において良好な増幅結果を与えるように設計されている。ここで「良好な」とは、目的の16s rRNAが十分増幅されていることのみならず、16s rRNA以外の産物が無いことを意味する。

【0155】

また、ここで「良好な」とは、検体中に含まれる検体由来のヒトゲノム遺伝子を増幅せずに、感染症起炎菌16srRNAのみを増幅することをも意味する。

【0156】

本実施形態に用いられる検体としては、ヒト、家畜等の動物由来の血液、喀痰、胃液、膣分泌物、口腔内粘液等の体液、尿及び糞便のような排出物等、細菌が存在すると思われるあらゆる物を対象とする。また、食中毒、汚染の対象となる食品、飲料水及び温泉水のような自然環境中の水、空気清浄機や浄水器のフィルタ等、細菌による汚染が引き起こされる可能性のある媒体全てが挙げられる。さらに、輸出入時における検疫等の動植物も検体としてその対象となり得る。

【0157】

また、本実施形態に用いられるPCR反応とは、抽出した核酸そのものを鋳型として用いたPCR反応、或いは該PCR増幅物を鋳型として、さらに配列番号107～109（表11のF1～F3）、或いは配列番号110～112（表11のR1～R3）の片側のプライマーを用いた非対称PCR反応、可視化のために標識物を取り込ませるPCR法等いずれの反応をも含む。

【0158】

[1. 検体増幅用PCR Primer の準備]

起炎菌検出用の為の16s rRNA遺伝子（標的遺伝子）増幅用PCR Primerとして表11に示す核酸配列を設計した。

【0159】

具体的には、16s rRNAをコーディングしているゲノム部分を特異的に増幅するプローブセット、つまり約1500塩基長の16srRNAコーディング領域の両端部分で、特異的な融解温度ができるだけ揃えたプライマーを設計した。なお、変異株や、ゲノム上に複数存在する16s rRNAコーディング領域も同時に増幅できるように複数種類のプライマーを設計した。

【0160】

表11中に示したプライマーは、合成後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により精製され、3種のForwardPrimerと3種のReverse Primerの全てを混合し、それぞれのプライマー濃度が、最終濃度10 pmol/μlとなるようにTE緩衝液に溶解した。なお、本実施例では全てのForwardPrimerとReverse Primerを用いたが、Forward PrimerとReverse Primerの夫々から1～3種類ずつを用いるようにしてもよい。

【0161】

以上により生成したForward PrimerとReverse Primerの溶液（ForwardPrimer mix及びR

everse Primer mix) を用いて、[3. 各起炎菌Genome DNA (モデル検体) の抽出]で説明した方法で抽出したGenome DNAを、[5. 検体の増幅と標識化 (PCR増幅&蛍光標識の取り込み)]で説明した手法により増幅する。

【0162】

反応終了後、精製用カラム (QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit) を用いてPrimerを除去した後、増幅産物をゲル電気泳動により検討した。1500塩基対領域に1バンドが検出され、良好にPCR反応が行なわれていることが確認できた。また、副産物は無かった。

【0163】

なお、表11のプライマーを用いることにより、例えば上述した10種の感染症起炎菌(黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌、セラチア菌、肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌、腸球菌、及びエンテロコッカス・フェカリス菌)の全てにおいて、良好なPCR増幅の増幅結果を得ることができた。

【0164】

<実施例5> 血液と菌液の混合物からの16s RNA遺伝子の増幅

ヒトの血液 $200\mu l$ (採血EDTA血) に実施例1で説明し手順で培養した腸球菌を 10^3 、 10^4 、 10^5 加え、菌血症モデル系とした。この溶液のそれぞれにN-アセチルムラミダーゼ溶液 (0.2mg/ml in Enzyme Buffer) を加え、37℃30分加温した後、Qiamp Blood mini Kit (キヤゲン社製) を用いてDNAを抽出し、PCR反応用のテンプレートとした。

【0165】

これらのDNAに対して実施例4と同様、表11のプライマーセットを用いてPCR反応を行なった。

【0166】

その結果、実施例4と同様、1500塩基対長領域にバンドが検出され、良好にPCR反応が行なわれていることが確認できた。また、副産物はなく、そのバンドから求めたPCR増幅産物の量は、加えた菌量に比例していた。このことは、このプライマーセットを用いた際に、ヒトゲノムのPCR産物はなく、腸球菌の16s RNAのみが増幅されたことを示している。

【0167】

以上説明したように、本実施形態によれば、複数種類の感染症起炎菌の遺伝子中の16s rRNA部分を効率良く、また高い純度で増幅することができる。また、ヒトゲノムDNA存在時においても感染症起炎菌の16s rRNAのみを効率よく増幅することができる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CANON INC.

<120> INFECTIOUS ETIOLOGIC AGENT DETECTION PROBE AND PROBE SET,
CARRIER, AND GENETIC SCREENING METHOD

<130> 5521784-01

<150> 2003-099452

<151> 2003-04-02

<150> 2003-099453

<151> 2003-04-02

<150> 2003-099454

<151> 2003-04-02

<150> 2003-099455

<151> 2003-04-02

<150> 2003-099456

<151> 2003-04-02

<150> 2003-099457

<151> 2003-04-02

<150> 2003-099458

<151> 2003-04-02

<150> 2003-099459

<151> 2003-04-02

<150> 2003-099460

<151> 2003-04-02

<150> 2003-099461

<151> 2003-04-02

<150> 2003-099462

<151> 2003-04-02

<150> 2003-099463

<151> 2003-04-02

<160> 218

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PA-1

<400> 1
gaaccgcatg gttcaaaagt gaaaga

26

<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PA-2

<400> 2
cacttataga tggatccgcfg ctgc

24

<210> 3
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PA-3

<400> 3
tgcacatctt gacggtagctt aatcag

26

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PA-4

<400> 4
cccccttagtg ctgcagctaa cg

22

<210> 5
<211> 23

<212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthesized DNA probe named PA-5

<400> 5
 aatacaaagg gcagcgaaac cgc

23

<210> 6
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthesized DNA probe named PA-6

<400> 6
 ccggtgaggat aaccttttag gagct

25

<210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthesized DNA probe named PA-7

<400> 7
 taaccttta ggagctagcc gtcga

25

<210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthesized DNA probe named PA-8

<400> 8
 tttaggagct agccgtcgaa ggt

23

<210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PA-9

<400> 9

tagccgtcga aggtgggaca aat

23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PA-10

<400> 10

acggacgaga agcttgcttc tct

23

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PA-11

<400> 11

tgtcacttat agatggatcc gcgc

25

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PA-12

<400> 12

tgtaagtaac tgtcacatc ttgacg

26

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

● <223> Synthesized DNA probe named PA-13

<400> 13

acaactctag agatagagcc ttcccc

26

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PA-14

<400> 14

gtggagtaac cttttaggag ctagcc

26

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PB-1

<400> 15

gaacagacga ggagcttgct cc

22

<210> 16

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PB-2

<400> 16

tagtgaaaga cggtttgct gtcact

26

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PB-3

<400> 17
taagtaacta tgcacgtctt gacggt 26

<210> 18
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PB-4

<400> 18
gaccgcctcta gagatagagt tttccc 26

<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PB-5

<400> 19
agtaaccatt tggagctagc cgtc 24

<210> 20
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PB-6

<400> 20
gagcttgctc ctctgacgtt agc 23

<210> 21
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PB-7

<400> 21
agccgggtgga gtaaccattt gg 22

<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PB-8

<400> 22
agacgaggag cttgctcctc tg 22

<210> 23
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PB-9

<400> 23
agaacaaatg tgtaagtaac tatgcacgt 29

<210> 24
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PB-10

<400> 24
accatttggaa gctagccgtc ga 22

<210> 25
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PC-1

<400> 25
ctcttgccat cggatgtgcc ca 22

<210> 26
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PC-2

<400> 26
ataaccttgc tcattgacgt tacccg

26

<210> 27
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PC-3

<400> 27
tttgctcatt gacgttaccc gcag

24

<210> 28
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PC-4

<400> 28
actggcaagc ttgagtctcg taga

24

<210> 29
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PC-5

<400> 29
atacaaagag aagcgacctc gcg

23

<210> 30
<211> 25

<212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthesized DNA probe named PC-6

<400> 30
 cggacctcat aaagtgcgtc gtagt

25

<210> 31
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthesized DNA probe named PC-7

<400> 31
 gcggggagga agggagtaaa gttaat

26

<210> 32
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthesized DNA probe named PC-8

<400> 32
 taacaggaag aagcttgctt ctttgctg

28

<210> 33
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthesized DNA probe named PC-9

<400> 33
 ttgccatcggt atgtgcccaat

22

<210> 34
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PC-10

<400> 34

ggaagggagt aaagttaata ccttgctc

29

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PC-11

<400> 35

atctttgtt gccagcggtc cg

22

<210> 36

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PC-12

<400> 36

aaggagtagaa agttaataacc ttgctcatt g

31

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PD-1

<400> 37

tagcacagag agcttgctct cg

23

<210> 38

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

● <223> Synthesized DNA probe named PD-2

<400> 38

tcatgccatc agatgtgcc aga

23

<210> 39

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PD-3

<400> 39

cggggaggaa ggcgataagg ttaat

25

<210> 40

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PD-4

<400> 40

ttcgattgac gttacccgca gaaga

25

<210> 41

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PD-5

<400> 41

ggtctgtcaa gtcggatgtg aaatcc

26

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PD-6

<400> 42
gcaggctaga gtctttaga gggg 24

<210> 43
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PD-7

<400> 43
tcatgccatc agatgtgccc agat 24

<210> 44
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PD-8

<400> 44
cggggaggaa ggcgataagg ttaa 24

<210> 45
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PD-9

<400> 45
ttatcgattg acgttacccg cagaaga 27

<210> 46
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PD-10

<400> 46
cattcgaaac tggcaggcta gagtc 25

<210> 47

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PD-11

<400> 47

cctttgttgc cagcggttag gc

22

<210> 48

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PE-1

<400> 48

tgaggggagaa agtggggat cttc

24

<210> 49

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PE-2

<400> 49

tcagatgagc ctagtcgga tttagc

25

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PE-3

<400> 50

gagctagagt acggtagagg gtgg

24

<210> 51
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PE-4

<400> 51
gtacggtaga gggtggtgga atttc

25

<210> 52
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PE-5

<400> 52
gaccacctgg actgatactg acac

24

<210> 53
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PE-6

<400> 53
tggcttgac atgctgagaa ctttc

25

<210> 54
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PE-7

<400> 54
ttagttacca gcacacctggg tgg

23

<210> 55
<211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthesized DNA probe named PE-8

<400> 55
 tagtctaacc gcaaggggga cg 22

<210> 56
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthesized DNA probe named PE-9

<400> 56
 tgcatccaaa actactgagc tagagtac 28

<210> 57
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthesized DNA probe named PE-10

<400> 57
 gtcgacttagc cgttgggatc ct 22

<210> 58
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthesized DNA probe named PF-1

<400> 58
 tagcacaggg agcttgctcc ct 22

<210> 59
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PF-2

<400> 59

aggtggtgag cttataacgc tcatac

25

<210> 60

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PF-3

<400> 60

tcatcaattg acgttactcg cagaag

26

<210> 61

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PF-4

<400> 61

actgcatttg aaactggcaa gctaga

26

<210> 62

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PF-5

<400> 62

ttatccttg ttgcagcttc ggcc

24

<210> 63

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

● <223> Synthesized DNA probe named PF-6

<400> 63

actttcagcg aggaggaagg tgg

23

<210> 64

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PF-7

<400> 64

ggttagcacag gggagcttgc tc

22

<210> 65

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PF-8

<400> 65

cgaggaggaa ggtggtgagc ttaata

26

<210> 66

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PF-9

<400> 66

tacgctcatc aattgacgtt actcgc

26

<210> 67

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PF-10

| | |
|---|----|
| <400> 67 | |
| gaaaactggca agcttagagtc tcgtaga | 27 |
| | |
| <210> 68 | |
| <211> 24 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial | |
| | |
| <220> | |
| <223> Synthesized DNA probe named PF-11 | |
| | |
| <400> 68 | |
| ttatccttg ttgccagcgg ttcg | 24 |
| | |
| <210> 69 | |
| <211> 25 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial | |
| | |
| <220> | |
| <223> Synthesized DNA probe named PG-1 | |
| | |
| <400> 69 | |
| agtagaacgc tgaaggagga gcttg | 25 |
| | |
| <210> 70 | |
| <211> 25 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial | |
| | |
| <220> | |
| <223> Synthesized DNA probe named PG-2 | |
| | |
| <400> 70 | |
| cttgcacatcac taccagatgg acctg | 25 |
| | |
| <210> 71 | |
| <211> 26 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial | |
| | |
| <220> | |
| <223> Synthesized DNA probe named PG-3 | |
| | |
| <400> 71 | |
| tgagagtggaa aagttcacac tgtgac | 26 |

<210> 72
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PG-4

<400> 72
gctgtggctt aaccatagta ggcttt 26

<210> 73
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PG-5

<400> 73
aagcggctct ctggcttgta act 23

<210> 74
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PG-6

<400> 74
tagacccttt ccggggttta gtgc 24

<210> 75
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PG-7

<400> 75
gacggcaagg taatcttta aagcca 26

<210> 76
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PG-8

<400> 76
gacatttgct taaaagggtgc acttgca

27

<210> 77
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PG-9

<400> 77
gttgtaagag aagaacgagt gtgagagtg

29

<210> 78
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PH-1

<400> 78
gcttgggaat ctggcttatg gagg

24

<210> 79
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PH-2

<400> 79
tgccatagga tgagcccaag tgg

23

<210> 80
<211> 26

| | | |
|--|--|----|
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> Synthesized DNA probe named PH-3 | | |
| | | |
| <400> 80 | | |
| cttgggaatg tactgacgct catgtg | | 26 |
| | | |
| <210> 81 | | |
| <211> 23 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> Synthesized DNA probe named PH-4 | | |
| | | |
| <400> 81 | | |
| ggattgggct tagagcttgg tgc | | 23 |
| | | |
| <210> 82 | | |
| <211> 22 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> Synthesized DNA probe named PH-5 | | |
| | | |
| <400> 82 | | |
| tacagaggga agcgaagctg cg | | 22 |
| | | |
| <210> 83 | | |
| <211> 26 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> Synthesized DNA probe named PH-6 | | |
| | | |
| <400> 83 | | |
| ggcgtttacc acggtatgat tcata | | 26 |
| | | |
| <210> 84 | | |
| <211> 23 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial | | |

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PH-7

<400> 84

aatgcctacc aagcctgcga tct

23

<210> 85

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PH-8

<400> 85

tatcggaga tgaaagtgcg ggact

25

<210> 86

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PI-1

<400> 86

cagagagctt gctctcggtt ga

22

<210> 87

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PI-2

<400> 87

gggaggaagg ttgttggtt aataac

26

<210> 88

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

● <223> Synthesized DNA probe named PI-3

<400> 88

ggtgttgg ttaataacca cagcaa

26

<210> 89

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PI-4

<400> 89

gcggctgtc aagtccgatg tg

22

<210> 90

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PI-5

<400> 90

attcgaaact ggcaggctag agtct

25

<210> 91

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PI-6

<400> 91

taaccacagc aattgacgtt acccg

25

<210> 92

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA probe named PI-7

| | |
|---|----|
| <400> 92 | |
| gcaattgacg ttacccgcag aaga | 24 |
| | |
| <210> 93 | |
| <211> 23 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial | |
| | |
| <220> | |
| <223> Synthesized DNA probe named PI-8 | |
| | |
| <400> 93 | |
| gtagcacaga gagcttgctc tcg | 23 |
| | |
| <210> 94 | |
| <211> 23 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial | |
| | |
| <220> | |
| <223> Synthesized DNA probe named PI-9 | |
| | |
| <400> 94 | |
| cggggaggaa ggtgttgtgg tta | 23 |
| | |
| <210> 95 | |
| <211> 23 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial | |
| | |
| <220> | |
| <223> Synthesized DNA probe named PI-10 | |
| | |
| <400> 95 | |
| accacagcaa ttgacgttac ccg | 23 |
| | |
| <210> 96 | |
| <211> 26 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial | |
| | |
| <220> | |
| <223> Synthesized DNA probe named PI-11 | |
| | |
| <400> 96 | |
| gaaactggca ggctagagtc ttgttag | 26 |

<210> 97
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PI-12

<400> 97
aggcggtctg tcaagtcgga tg 22

<210> 98
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PJ-1

<400> 98
ttctttcctc ccgagtgc tt gca 23

<210> 99
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PJ-2

<400> 99
aacacgtggg taacctaccc atcag 25

<210> 100
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PJ-3

<400> 100
atggcataag agtgaagggc gctt 24

<210> 101
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PJ-4

<400> 101
gaccgcggt gcattagcta gt

22

<210> 102
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PJ-5

<400> 102
ggacgttagt aactgaacgt cccct

25

<210> 103
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PJ-6

<400> 103
ctcaaccggg gagggtcatt gg

22

<210> 104
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized DNA probe named PJ-7

<400> 104
ttggagggtt tccgcccttc ag

22

<210> 105
<211> 25

| | | |
|--|--|----|
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> Synthesized DNA probe named PJ-8 | | |
| | | |
| <400> 105 | | |
| atagagctt cccttcgggg acaaa | | 25 |
| | | |
| <210> 106 | | |
| <211> 29 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> Synthesized DNA probe named PJ-9 | | |
| | | |
| <400> 106 | | |
| cgaggtcatg caaatctctt aaagcttct | | 29 |
| | | |
| <210> 107 | | |
| <211> 23 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> Synthesized DNA for forward primer named F-1 | | |
| | | |
| <400> 107 | | |
| gcggcgtgcc taatacatgc aag | | 23 |
| | | |
| <210> 108 | | |
| <211> 23 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial | | |
| | | |
| <220> | | |
| <223> Synthesized DNA for forward primer named F-2 | | |
| | | |
| <400> 108 | | |
| gcggcaggcc taacacatgc aag | | 23 |
| | | |
| <210> 109 | | |
| <211> 23 | | |
| <212> DNA | | |
| <213> Artificial | | |

<220>

<223> Synthesized DNA for forward primer named F-3

<400> 109

gcggcaggct taacacatgc aag

23

<210> 110

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA for reverse primer named R-1

<400> 110

atccagccgc acttccgat ac

22

<210> 111

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA for reverse primer named R-2

<400> 111

atccaaccgc aggtccccct ac

22

<210> 112

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthesized DNA for reverse primer named R-3

<400> 112

atccagccgc aggtccccct ac

22

<210> 113

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PA-1

<400> 113

tcttcactt ttgaaccatg cggttc

26

<210> 114

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PA-2

<400> 114

gcagcgcgga tccatctata agtg

24

<210> 115

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PA-3

<400> 115

ctgatttagt accgtcaaga tgtgca

26

<210> 116

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PA-4

<400> 116

cgtagctgc agcactaagg gg

22

<210> 117

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PA-5

<400> 117
gcggttcgc tgcccttgt att 23

<210> 118
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PA-6

<400> 118
agtcctaaa aggttactcc accgg 25

<210> 119
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PA-7

<400> 119
tcgacggcta gctcctaaaa ggtta 25

<210> 120
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PA-8

<400> 120
accttcgacg gctagtcct aaa 23

<210> 121
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PA-9

<400> 121

●
atttgtccca ccttcgacgg cta

23

<210> 122
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PA-10

<400> 122
agagaagcaa gcttctcgac cgt

23

<210> 123
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PA-11

<400> 123
agcgcggatc catctataag tgaca

25

<210> 124
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PA-12

<400> 124
cgtcaagatg tgcacagtta cttaca

26

<210> 125
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PA-13

<400> 125
ggggaaggct ctatctctag agttgt

26

<210> 126

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PA-14

<400> 126

ggctagctcc taaaagggtta ctccac

26

<210> 127

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PB-1

<400> 127

ggagcaagct cctcgtctgt tc

22

<210> 128

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PB-2

<400> 128

agtgacagca aaaccgtctt tcacta

26

<210> 129

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PB-3

<400> 129

accgtcaaga cgtgcatagt tactta

26

<210> 130

<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PB-4

<400> 130
gggaaaactc tatctctaga ggggtc 26

<210> 131
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PB-5

<400> 131
gacggctagc tccaaatggc tact 24

<210> 132
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PB-6

<400> 132
gctaacgtca gaggagcaag ctc 23

<210> 133
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PB-7

<400> 133
ccaaatggtt actccaccgg ct 22

<210> 134
<211> 22
<212> DNA

● <213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PB-8

<400> 134

cagaggagca agtcctcgta ct

22

<210> 135

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PB-9

<400> 135

acgtgcata gttacttacac atttgttct

29

<210> 136

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PB-10

<400> 136

tgcacggcta gctccaaatg gt

22

<210> 137

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PC-1

<400> 137

tgggcacatc cgatggcaag ag

22

<210> 138

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PC-2

<400> 138

cgggttaacgt caatgagcaa aggtat

26

<210> 139

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PC-3

<400> 139

ctgcggtaa cgtcaatgag caaa

24

<210> 140

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PC-4

<400> 140

tctacgagac tcaagttgc cagt

24

<210> 141

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PC-5

<400> 141

cgcgaggatcg cttcttttg tat

23

<210> 142

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PC-6

<400> 142
actacgacgc actttatgag gtccg 25

<210> 143
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PC-7

<400> 143
attaacttta ctcccttcct ccccg 26

<210> 144
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PC-8

<400> 144
cagcaaagaa gcaagcttct tcctgtta 28

<210> 145
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PC-9

<400> 145
atctgggcac atccgatggc aa 22

<210> 146
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PC-10

<400> 146

| | |
|---|----|
| gagcaaaggta attaacttta ctcccttcc | 29 |
| | |
| <210> 147 | |
| <211> 22 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial | |
| | |
| <220> | |
| <223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PC-11 | |
| | |
| <400> 147 | |
| cggaccgcgtg gcaacaaaag at | 22 |
| | |
| <210> 148 | |
| <211> 31 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial | |
| | |
| <220> | |
| <223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PC-12 | |
| | |
| <400> 148 | |
| caatgagcaa aggtattaac ttactccct t | 31 |
| | |
| <210> 149 | |
| <211> 23 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial | |
| | |
| <220> | |
| <223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PD-1 | |
| | |
| <400> 149 | |
| ccgagagcaa gctctctgtg cta | 23 |
| | |
| <210> 150 | |
| <211> 23 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial | |
| | |
| <220> | |
| <223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PD-2 | |
| | |
| <400> 150 | |
| tctgggcaca tctgatggca tga | 23 |

<210> 151

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PD-3

<400> 151

attaacctta tcgccttcct ccccg

25

<210> 152

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PD-4

<400> 152

tcttctgcgg gtaacgtcaa tcgaa

25

<210> 153

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PD-5

<400> 153

ggatttcaca tccgacttgaa cagacc

26

<210> 154

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PD-6

<400> 154

ccccctctaca agactcttagc ctgc

24

<210> 155



<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PD-7

<400> 155
atctggcac atctgatggc atga 24

<210> 156
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PD-8

<400> 156
ttaaccattat cgccttcctc cccg 24

<210> 157
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PD-9

<400> 157
tcttctgcgg gtaacgtcaa tcgataa 27

<210> 158
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PD-10

<400> 158
gactctagcc tgccagttc gaatg 25

<210> 159
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PD-11

<400> 159

gcctaacccgc tggcaacaaa gg

22

<210> 160

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PE-1

<400> 160

gaagatcccc cactttctcc ctca

24

<210> 161

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PE-2

<400> 161

gctaattccga cctaggctca tctga

25

<210> 162

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PE-3

<400> 162

ccaccctcta ccgtactcta gctc

24

<210> 163

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PE-4

<400> 163

gaaattccac caccctctac cgtac

25

<210> 164

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PE-5

<400> 164

gtgtcagttat cagtccaggtt ggtc

24

<210> 165

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PE-6

<400> 165

gaaaggttctc agcatgtcaa ggcca

25

<210> 166

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PE-7

<400> 166

ccacccgagg tgctggtaac taa

23

<210> 167

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PE-8

<400> 167
cgtccccctt gcggtagac ta 22

<210> 168
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PE-9

<400> 168
gtactctagc tcagtagttt tggatgca 28

<210> 169
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PE-10

<400> 169
aggatcccaa cggctagtcg ac 22

<210> 170
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PF-1

<400> 170
agggagcaag ctccctgtgc ta 22

<210> 171
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PF-2

<400> 171

gatgagcgta ttaagctcac cacct 25

<210> 172
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PF-3

<400> 172
cttctgcgag taacgtcaat tgatga 26

<210> 173
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PF-4

<400> 173
tctagttgc cagttcaaa tgcagt 26

<210> 174
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PF-5

<400> 174
ggccgaagct gcaacaaagg ataa 24

<210> 175
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PF-6

<400> 175
ccacaccttccct cctcgctgaa agt 23

<210> 176

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PF-7

<400> 176

gagcaagctc ccctgtgcta cc

22

<210> 177

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PF-8

<400> 177

tattaagctc accaccccttcc tcctcg

26

<210> 178

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PF-9

<400> 178

gcgagtaacg tcaatttgatg agcgta

26

<210> 179

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PF-10

<400> 179

tctacgagac tctagcttgc cagtttc

27

<210> 180

<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PF-11

<400> 180
cgaaccgctg gcaacaaagg ataa 24

<210> 181
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PG-1

<400> 181
caagctccctc cttagcggtt ctact 25

<210> 182
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PG-2

<400> 182
caggtccatc tggttagtgat gcaag 25

<210> 183
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PG-3

<400> 183
gtcacagtgt gaactttcca ctctca 26

<210> 184
<211> 26
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PG-4

<400> 184

aaagcctact atggtaaggc cacagc

26

<210> 185

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PG-5

<400> 185

agttaacaaggc cagagagccg ctt

23

<210> 186

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PG-6

<400> 186

cgactaaacc ccggaaaggg tcta

24

<210> 187

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PG-7

<400> 187

tggcttaag agattagctt gccgtc

26

<210> 188

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PG-8

<400> 188

tgcaagtgca cctttaagc aaatgtc

27

<210> 189

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PG-9

<400> 189

cactctcaca ctcgttcttc tcttacaac

29

<210> 190

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PH-1

<400> 190

cctccataag ccagattccc aagc

24

<210> 191

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PH-2

<400> 191

ccacttgggc tcatcctatg gca

23

<210> 192

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PH-3

<400> 192
cacatgagcg tcagtagcatt cccaaag 26

<210> 193
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PH-4

<400> 193
gcaccaagct ctaagccaa tcc 23

<210> 194
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PH-5

<400> 194
cgcagttcg ctccctctg ta 22

<210> 195
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PH-6

<400> 195
tcatgaatca taccgtggta aacgcc 26

<210> 196
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PH-7

<400> 196

| | |
|--|----|
| agatcgagg cttggtaggc att | 23 |
| | |
| <210> 197 | |
| <211> 25 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial | |
| | |
| <220> | |
| <223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PH-8 | |
| | |
| <400> 197 | |
| agtccgcac tttcatcttc cgata | 25 |
| | |
| <210> 198 | |
| <211> 23 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial | |
| | |
| <220> | |
| <223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PI-1 | |
| | |
| <400> 198 | |
| tgcagaact cgggaggaaa gaa | 23 |
| | |
| <210> 199 | |
| <211> 25 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial | |
| | |
| <220> | |
| <223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PI-2 | |
| | |
| <400> 199 | |
| ctgatggta gtttacccac gtgtt | 25 |
| | |
| <210> 200 | |
| <211> 24 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial | |
| | |
| <220> | |
| <223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PI-3 | |
| | |
| <400> 200 | |
| aagcgcctt cactttatg ccat | 24 |

<210> 201

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PI-4

<400> 201

actagctaat gcaccgcggg tc

22

<210> 202

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PI-5

<400> 202

aggggacgtt cagttactaa cgtcc

25

<210> 203

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PI-6

<400> 203

ccaatgaccc tccccggttg ag

22

<210> 204

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PI-7

<400> 204

ctgaaggcg gaaaccctcc aa

22

<210> 205

<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PI-8

<400> 205
cgagagcaag ctctctgtgc tac 23

<210> 206
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PI-9

<400> 206
taaccacaac acttcctcc ccg 23

<210> 207
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PI-10

<400> 207
cgggtaacgt caattgctgt ggt 23

<210> 208
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PI-11

<400> 208
ctacaagact ctagcctgcc agtttc 26

<210> 209
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PI-12

<400> 209

catccgactt gacagaccgc ct

22

<210> 210

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PJ-1

<400> 210

tcacccgaga gcaagctctc tg

22

<210> 211

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PJ-2

<400> 211

gttattaaacc acaacacattt cctccc

26

<210> 212

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PJ-3

<400> 212

ttgctgttgtt tattaaccac aacacc

26

<210> 213

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PJ-4

<400> 213

cacatccgac ttgacagacc gc

22

<210> 214

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PJ-5

<400> 214

agactctagc ctgccagttt cgaat

25

<210> 215

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PJ-6

<400> 215

cgggtaacgt caattgctgt ggtta

25

<210> 216

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PJ-7

<400> 216

tcttctgcgg gtaacgtcaa ttgc

24

<210> 217

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PJ-8

<400> 217

tttgtcccg aaggaaagc tctat

25

<210> 218

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Complementary DNA Sequence of Synthesized DNA probe PJ-9

<400> 218

agaagctta agagattgc atgacctcg

29

【書類名】要約書

【要約】

【課題】一度に大量調製することが可能であり、かつ、類似菌種間における菌種の同定が可能な感染症検出用プローブを提供する。

【解決手段】感染症起炎菌遺伝子を検出するための感染症起炎菌検出用プローブセットは、SEQ ID No. 1～14の塩基配列及びその相補配列を含む第1群と、SEQ ID No. 15～24の塩基配列及びその相補配列を含む第2群と、SEQID No. 25～36の塩基配列及びその相補配列を含む第3群と、SEQ ID No. 37～47の塩基配列及びその相補配列を含む第4群と、SEQ IDNo. 48～57の塩基配列及びその相補配列を含む第5群と、SEQ ID No. 58～68の塩基配列及びその相補配列を含む第6群と、SEQ ID No. 69～77の塩基配列及びその相補配列を含む第7群と、SEQID No. 78～85の塩基配列及びその相補配列を含む第8群と、SEQ ID No. 86～97の塩基配列及びその相補配列を含む第9群と、SEQ IDNo. 98～106の塩基配列及びその相補配列を含む第10群より選択された複数群の各々から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドで形成される複数種類のプローブを含む。

認定・付加情報

| | |
|---------|------------------|
| 特許出願の番号 | 特願 2004-077045 |
| 受付番号 | 50400442779 |
| 書類名 | 特許願 |
| 担当官 | 第五担当上席 0094 |
| 作成日 | 平成 16 年 3 月 22 日 |

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000001007

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号

【氏名又は名称】 キヤノン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100076428

【住所又は居所】 東京都千代田区紀尾井町3番6号 秀和紀尾井町
パークビル7F 大塚国際特許事務所

【氏名又は名称】 大塚 康徳

【選任した代理人】

【識別番号】 100112508

【住所又は居所】 東京都千代田区紀尾井町3番6号 秀和紀尾井町
パークビル7F 大塚国際特許事務所

【氏名又は名称】 高柳 司郎

【選任した代理人】

【識別番号】 100115071

【住所又は居所】 東京都千代田区紀尾井町3番6号 秀和紀尾井町
パークビル7F 大塚国際特許事務所

【氏名又は名称】 大塚 康弘

【選任した代理人】

【識別番号】 100116894

【住所又は居所】 東京都千代田区紀尾井町3番6号 秀和紀尾井町
パークビル7F 大塚国際特許事務所

【氏名又は名称】 木村 秀二

特願 2004-077045

出願人履歴情報

識別番号 [000001007]

1. 変更年月日 1990年 8月30日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
氏名 キヤノン株式会社